



**Etude synergique du couplage du Système
Lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles
actives ayant des propriétés antifongiques pour
l'amélioration de la conservation en frais des bananes**

Woeheoudama Sagoua

► **To cite this version:**

Woeheoudama Sagoua. Etude synergique du couplage du Système Lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des bananes. Sciences de la Terre. Université d'Avignon, 2009. Français. <tel-00468850>

HAL Id: tel-00468850

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00468850>

Submitted on 31 Mar 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de l'UNIVERSITE d'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Discipline : Sciences Agronomiques

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés-Sciences des Aliments, Montpellier

présentée et soutenue publiquement

par

.Woeheoudama SAGOUA

Le 10 Décembre 2009

Titre :

**Etude synergique du couplage du Système Lactoperoxydase avec
d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés
antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des
bananes**

JURY

M. EI MAATAOUI	Professeur à l'Université d'Avignon	, Président du jury
H. JIJAKLI	Professeur à l'Université de Gembloux	, Rapporteur
E. Ait BARKA	Professeur à l'Université de Reims	, Rapporteur
G. LOISEAU	Maître de Conférences à SupAgro	, Co-directeur
M.N. DUCAMP	Ingénieur de Recherche au CIRAD	, Co-directeur
A. COUDRET	Professeur à l'Université d'Avignon	, Directeur de Thèse
M. DEGRE	Directeur de Nutrigenix	, Invité

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu se faire sans l'aide et l'encouragement de tous, merci donc à vous tous pour votre implication dans cette thèse. Néanmoins, je tiens à remercier particulièrement :

Max REYNES, Directeur de l'UMR Qualisud, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein de son unité.

Le Pr. Alain COUDRET d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour ses conseils.

Merci également à Marie-Noëlle DUCAMP et Gérard LOISEAU pour avoir tout d'abord cru en moi, pour avoir permis que cette thèse ait lieu et pour finir d'avoir accepté de me codiriger au CIRAD.

Merci à vous, Messieurs les membres du Jury, pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'examiner ce travail :

Pr. JIJAKLI (rapporteur), Dr. Ait BARKA (rapporteur), Pr. El MAATAOUI (examineur), M. DEGRE (invité).

Je remercie l'ensemble du personnel de la halle de technologie du CIRAD pour leur accueil et leur aide dans ces travaux de thèse et plus particulièrement Pierre PRUVOST, Marie-Christine LAHON, Jean-Michel MEOT, Olivier GIBERT, Julien RICCI, Jean-Claude DUMAS, Thierry GOLI.

Je remercie également tout le personnel du bâtiment 16 du CIRAD qui d'une manière ou une autre ont aidé à l'avancement de mes travaux à savoir : Jean-Claude MANEZE, Renaud BOULANGER, Jean-Marc BROUILLET, Laurent BERTHIOT, Nathalie PAILLUSSON, Gilles MOREL, Marc LEBRUN, Georges PIOMBO, Nathalie BAROUH, Bruno BAREA, Clara LACHGAR, Noël DURAND, Dominique GUEULE.

Merci aussi à tous mes collègues et amis thésards et/ou docteur du CIRAD et de l'INRA à savoir, Yohan, Privat, Emma, Emilie D., Emilie B., Marie, Christelle, Matthieu, Luis, Oscar, Aly, Mohamed, Duy, Lamiaa, Florence, Christian, Félix.

Je n'oublie pas Anne MARECHAL, Sonia BOUQUET, Ghalia RHOUL, stagiaires avec qui j'ai travaillé et dont j'ai aimé le grand enthousiasme.

Merci aussi à toi Guy SELF pour tes nombreux conseils, pour toutes les fois où tu as révisé mon anglais pour les publications et puis aussi pour les statistiques, thanks a lot !!!!

Merci aussi à Fabienne Ribeyre pour son aide en statistique et pour avoir assisté à mes répétitions.

Merci à vous Didier Montet, pour vos encouragements pour vos critiques aussi sur le manuscrit et votre grande disponibilité.

Merci à toi Marie-Pierre pour la mise en page du manuscrit et puis plus personnellement de m'avoir emmené au commissariat lorsque j'étais harcelée.

Merci à toi également Jocelyne pour ta grande gentillesse à mon égard et puis je persiste à dire : « tu es la meilleure !!! ».

Merci à Isabelle METAYER pour son aide et sa grande sympathie.

Une pensée pour Laetitia, merci d'avoir été bien plus qu'une amie, ma famille sur Montpellier, sans oublier ma petite Raphaëlle et puis le petit nouveau au club Mikaël !!

Pour terminer, je veux aussi remercier mes parents, mon frère Alain SAGOUA, ma tante Christine Takassi, ma cousine Edwige Takassi pour leur soutien moral et financier durant ces trois dernières, je pense que je n'y serai jamais arrivée sans vous, encore une fois merci du fond du coeur !!!!!!!

RESUME

L'antracnose constitue pour plusieurs productions végétales une maladie importante qui engendre des pertes post récoltes considérables. *Colletotrichum musae* est le responsable de cette maladie chez la banane dessert. L'utilisation d'antimicrobiens naturels comme le système lactoperoxydase (LPS) représente une voie naturelle de lutte intéressante contre l'antracnose. Dans cette étude, nous avons amélioré le LPS en ajoutant de l'iode dans le système existant ou en substituant le thiocyanate par de l'iode. La substitution du thiocyanate à l'iode a permis d'avoir un effet fongicide du LPS.

De plus, d'autres substances comme la lactoferrine, le Bioxeda® et l'huile de Neem ont été étudiées pour leur effet antifongique. Les deux dernières substances ont donné une inhibition supérieure respectivement à 90% et à 40%, tandis qu'il n'y a eu aucun effet de la lactoferrine.

Mot-Clés : **LPS, lactoferrine, Bioxeda®**, **anthracnose, banane, Huile de Neem, *Colletotrichum musae***

ABSTRACT

Postharvest diseases are a major concern for several plant products, leading to considerable postharvest losses. *Colletotrichum musae* is responsible for anthracnose and is also involved in crown rot, the two main postharvest diseases of bananas. The use of natural anti-microbial agents such as the lactoperoxidase system (LPS) represents an interesting alternative to the use of fungicides for the control of postharvest diseases of bananas. This study consisted on optimization of the LPS by adding iodide or substituting the thiocyanate by iodide.

Moreover, other substances like lactoferrin, Bioxeda® and Neem oil were analyzed for their antifungal effect. The last two compounds gave an inhibition higher than 90% and 40% respectively. No effect of lactoferrin was observed.

Key-Words: **LPS, lactoferrin, Bioxeda®**, **anthracnose, banana, Neem oil, *Colletotrichum musae***

Liste des abréviations

ANOVA : Analysis of Variance

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

Br⁻ : ion bromure

CFU : colonie formant unité

CIRAD : centre international de recherche agronomique pour le développement

Cl⁻ : ion chlorure

cm : centimetre

Co : Cobalt

CPG : chromatographie phase gazeuse

Cu : cuivre

°C : Degré Celsius

DTNB : 3-carboxy-4-nitrophenydisulfide

DVV : Durée de vie verte des fruits

= : égale

ESI : ionisation par électronébulisation

Fe : fer

g : gramme

GO : glucose oxudase

h : heure

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HPLC : Chromatographie en phase gazeuse à haute performance

I⁻ : ion iodure

IRD : institut de recherche pour le développement

K_D : constante d'affinité

kDa : kilodalton

Kg : kilogramme

Ki : iodure de potassium

L : litre

LF : lactoferrine

LP : lactoperoxydase

LPI : système lactoperoxydase-peroxyde d'hydrogène-iode

LPS : système lactoperoxydase-peroxyde d'hydrogène-thiocyanate

LPSI : système lactoperoxydase-peroxyde d'hydrogène-thiocyanate-iode

LYS: lysozyme

MeOH : méthanol

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

mm² : millimètre carré

mV : millivolt

NaBH₄ : Borohydrate de sodium

Ni : nickel

nm : nanometre

2n : nombre de chromosomes

ø : diamètre

OBr⁻: ion hypo

OI⁻ : ion hypoiodide

OSCN⁻ : ion hypothiocyanate

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

pH : potentiel hydrogène

pK : potentiel de dissociation

% : pourcentage

sec : seconde

SPME : Micro Extraction en Phase Solide

UV : rayonnement ultra-violet

μL : microlitre

μM : micromolaire

v/v : volume par volume

w/v : poids par volume

Zn : Zinc

Figures

Figure 1 : Diagramme de classification des cultivars à fruits parthénocarpiques	5
Figure 2 : Schéma d'organisation du bananier (d'après Champion, 1963)	7
Figure 3 : Les différentes phases de découpe et de conditionnement des fruits à la station d'emballage (Chillet, 2003).	10
Figure 4 : Echelle colorimétrique standard pour les bananes dessert du sous-groupe Cavendish en fonction du stade de maturation (Source : Fruidor)	12
Figure 5 : Acervules et conidies de <i>Colletotrichum musae</i> (source : de Lapeyre, 1999).	17
Figure 6 : Cycle infectieux de l'anthracnose du bananier	19
Figure 7 : Germination et formation d'un appressorium à partir d'une conidie de <i>Colletotrichum musae</i>	23
Figure 8 : Différentes altérations associées à <i>Colletotrichum musae</i>	24
Figure 9 : <i>Azadirachta indica</i> (Neem)	30
Figure 10 : <i>Melia azedarach</i> : vue globale de l'arbre (a), fruits (b), feuilles (c) (source : W.SAGOUA)	37
Figure 11 : Structure schématique tridimensionnelle de la molécule de lactoperoxydase bovine.	39
Figure 12 : Oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase	42
Figure 13 : Oxydation des groupes sulphydryles des protéines (enzymes) catalysée par la lactoperoxydase	43
Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la lactoferrine bovine (en présence d'ions Fe^{3+})	47
Figure 15 : Schéma du procédé d'obtention d'huile par pression à froid	54
Figure 16 : Montage de la presse mécanique : général (a) et détail de l'extraction (b)	55
Figure 17 : Schéma du procédé d'extraction de l'huile au Soxhlet	57
Figure 18 : Schéma d'extraction des triterpénoïdes de l'huile de Neem	62
Figure 19 : Illustration d'une boîte de Pétri avec de l'huile de Neem posée sur une lame de microscope sur le couvercle	72
Figure 20 : Evolution de la concentration relative (Concentration à l'instant T/Concentration initiale) en ions $OSCN^-$ pendant 10mn des LPS	76
Figure 21 : Effet du Système lactoperoxydase sur la biomasse de <i>Colletotrichum musae</i> C 62 (a), <i>Colletotrichum sp.</i> (b) et <i>Fusarium sp.</i> (c) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min)	79
Figure 22 : Effet des Systèmes lactoperoxydase modifiés <i>Colletotrichum musae</i> C 62 (a), <i>Colletotrichum sp.</i> (b) et <i>Fusarium sp.</i> (c) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min)	82
Figure 23 : Effet des Systèmes LPSI (a) et LPI (b) à différentes concentrations en iodure de potassium sur la biomasse de <i>Colletotrichum musae</i> C 62 après 18 h et 24 h de culture en milieu liquide PDB à 30°C sous agitation (140 trs.min ⁻¹)	84
Figure 24 : Effet de la LF, LPS et LF/LPS sur la croissance de <i>Colletotrichum musae</i> C 62 (a), <i>Colletotrichum sp.</i> (b) et <i>Fusarium sp.</i> (c) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min) et mesurée par turbidimétrie	86

Figure 25 : Effet des volatiles de Bioxeda® sur la croissance de différentes souches pathogènes de banane cultivées à 30°C mesurée après 2 jours (a, b et c) et 7 jours (d, e et f) de culture	88
Figure 26 : Effet du Bioxeda® incorporé dans du milieu de culture PDA sur la croissance de <i>Colletotrichum musae</i> C 62 (a), <i>Colletotrichum sp.</i> Co CMR 55 (b) et <i>Fusarium sp.</i> mesurée pendant 5 jours de culture à 30°C	90
Figure 27 : Graines de Neem et huiles extraites : (a) Cameroun (couleur verte, translucide) ; (b) Sénégal (couleur verte, trouble) et (c) Inde (couleur marron/orangée)	92
Figure 28 : Schéma et bilan matière de l'extraction par pression à froid d'huile de Neem du Sénégal, du Cameroun et d'Inde et de graines de Mélia.	94
Figure 29 : Profils chromatographiques des composés volatils obtenus par GC-MS d'huiles de graines de Neem du Cameroun, du Sénégal et d'Inde	106
Figure 30 : Profils chromatographiques des différentes huiles de Neem obtenus à 215 nm	109
Figure 31 : Effet des volatils d'huile de Neem obtenues par pression mécanique à froid (Cp) par Soxhlet (SM) et une huile commerciale (Com) sur la croissance de différentes souches pathogènes de banane cultivées à 30°C mesuré après 7 jours de culture	112
Figure 32 : Effet de l'huile de Neem après 2, 3, 6 et 7 jours à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 2%) dans du PDA sur la croissance de <i>Colletotrichum sp.</i> , cultivé à 30°C	115
Figure 33 : Effet d'une concentration de 2% (v/v) d'huile de Neem dans du milieu PDA sur la croissance après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture de différentes souches fongiques pathogènes de la banane cultivées à 30°C après 1, 2, 3, 4 et 5 jours.	116
Figure 34 : Effet de différentes huiles de Neem à la concentration de 2 % (v/v) dans du milieu PDA sur la croissance de <i>Colletotrichum musae</i> (a), <i>Colletotrichum sp.</i> (b) et <i>Fusarium sp.</i> (c), cultivées à 30°C pendant 5 jours de croissance	118
Figure 35 : Surfaces de nécrose (mm ²) de bananes obtenues après de 10 jours de conservation à 20°C et 90% d'humidité après un traitement au TBZ, LPS, LPSI, LPI, LPS+Neem (Sénégal, Cameroun, Inde), huile de Neem (Sénégal, Cameroun, Inde) et Bioxeda.	121

TABLEAUX

Tableau I : Principaux cultivars à fruits comestibles (Lassoudière, 2007).	6
Tableau II : Liste non exhaustive des espèces du genre <i>Colletotrichum</i> et des plantes qu'ils infectent (adaptée de Skipp <i>et al.</i> , 1995).	14
Tableau III : Données bibliographiques sur certaines caractéristiques culturales et pathogéniques de différents <i>Colletotrichum sp</i> isolés de bananier (de Lapeyre, 1999)	16
Tableau IV : Evolution du pouvoir pathogène d'isolats de <i>Colletotrichum sp</i> /banane sur différents hôtes (de Lapeyre, 1999)	18
Tableau V : Evaluation du pouvoir pathogène de <i>Colletotrichum sp</i> , isolés à partir de différents fruits, sur banane (de Lapeyre, 1999)	18
Tableau VI : Données bibliographiques sur les différentes espèces fongiques isolées à partir des pourritures de couronnes, dans différentes zones de production	26
Tableau VII : Composés bioactifs provenant du Neem (Biswas <i>et al.</i> , 2002)	34
Tableau VIII : Composition physico-chimique des feuilles de Neem	35
Tableau IX : Composition centésimale en acides gras de l'huile de Neem	36
Tableau X : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de Neem	36
Tableau XI : Caractéristiques physico-chimiques de la lactoperoxydase Bovine	39
Tableau XII : Quelques applications du LPS et leur fonctionnalité	44
Tableau XIII : Souches fongiques utilisées au cours de l'étude	53
Tableau XIV : Kit LPS fourni par BIOSERA E	64
Tableau XV : Composition des différents Systèmes Lactoperoxydase testés	64
Tableau XVI : Comparaison entre les différentes méthodes de dosage des ions hypothiocyanate	67
Tableau XVII : Différents traitements étudiés pour l'anthraxnose de blessure	73
Tableau XVIII : Conditions opératoires	76
Tableau XIX : Tableau récapitulatif des caractéristiques (concentrations des réactifs et conditions d'utilisation) de différents Systèmes lactoperoxydase utilisées dans la littérature	77
Tableau XX : Caractéristiques des différents LPS modifiés utilisés contre les trois souches	81
Tableau XXI : Quantité d'huile extraite dans les graines de Neem et de Méliá par première pression mécanique à froid	95
Tableau XXII : Calcul des pertes en huile dans les tourteaux, issus de la pression à froid	95
Tableau XXIII : Calcul des pertes en huile liées à la filtration de l'huile obtenue par pression à froid	95
Tableau XXIV : Quantité d'huile des graines de Neem et de Méliá obtenu par extraction au Soxhlet	95
Tableau XXV : Composition en acides gras des huiles de Neem du Sénégal, du Cameroun et d'Inde	97
Tableau XXVI : Comparaison de la composition en acides gras d'huiles de Neem du Sénégal, du Cameroun de notre étude et du Bénin	97
Tableau XXVII : Variabilité de la composition en acides gras des huiles	

d'Inde citées dans la littérature	97
Tableau XXVIII : Composition en composés volatils de l'huile de Neem (<i>Azadirachta indica</i>) extraite au Soxhlet (1), par pression mécanique à froid (2) d'huile commerciale (3) et de l'huile de Mélia (<i>Melia azedarach</i>) extraite au Soxhlet (4) et par pression mécanique à froid (5).	98
Tableau XXIX : Composition en volatils de l'huile de Neem (<i>Azadirachta indica</i>) de trois origines géographiques différentes (Inde, Sénégal et Cameroun).	103
Tableau XXX : Pourcentage d'inhibition obtenu sur des souches pathogènes exposées aux vapeurs d'huile Neem	111

Les résultats de ce travail ont été ou vont être publiés sous forme d'articles :

Effect of lactoperoxidase system on the control of Colletotrichum muase on bananas.

Sagoua, W., Ducamp, M.N., Loiseau, G., de Lapeyre de Bellaire, L. (soumis dans *Food Technology and Biotechnolgy*)

Investigation on Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil from Senegal, Cameroon and India for its potential use as an antifungal agent against banana fruit pathogens.

Sagoua, W., Ducamp, M.N., Loiseau, G., Morel, G., Piombo, G., Coudrtet, A. (soumis dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*).

Ils ont également fait l'objet d'une communication orale et d'un poster :

***In vitro* Antifungal Activity of Neem Oil Against Banana Pathogens** par W.SAGOUA. **4th International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits**, 3-7 Novembre 2008, Bogor, Indonésie.

Etude *in vitro* de l'activité antifongique de l'huile de Neem sur les pathogènes de la banane. Sagoua, W., Ducamps, M.N., Loiseau, G. **11^e Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales**, 17-19 Avril 2009, Grasse, France.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
Revue de la littérature	
I. LE BANANIER/LA BANANE	5
I.1. TAXONOMIE	5
I.2. MORPHOLOGIE DE LA PLANTE	8
I.2.1. Appareil végétatif	8
I.2.2. Description de l'inflorescence	8
I.3. ASPECT AGRONOMIQUE	9
I.3.1. De la floraison à la récolte	9
I.3.2. De la récolte au transport	11
I.4. LA BANANE	11
II. L'ANTHRACNOSE	13
II.1. L'ANTHRACNOSE	13
II.2. LE GENRE COLLETOTRICHUM	14
II.2.1. Eléments de taxonomie	14
II.2.2. Morphotaxonomie	14
II.2.3. Spécificité parasitaire	18
D'APRES DE LAPEYRE (1999).	19
II.3. L'EPIDEMIOLOGIE DES MALADIES PROVOQUEES PAR LES SOUCHES DU GENRE COLLETOTRICHUM	20
II.4.1. L'anthraxnose des fruits	25
II.4.2. Les pourritures de la couronne (crown rot)	25
II.5. LES DIFFERENTES MOYENS DE LUTTE ACTUELS CONTRE LES MALADIES CAUSEES PAR COLLETOTRICHUM MUSAE	27
II.5.1. les moyens de lutte avant la récolte	27
II.5.2. les moyens de lutte après la récolte	27
III. LE NEEM	31
III.1. LE NEEM	31
III.2. LA PLANTE	31
III.3. HISTORIQUE DU NEEM	32
III.4. TOXICITE	32
III.5. PROPRIETES ANTIMICROBIENNE ET THERAPEUTIQUE	33
III.6. COMPOSITION DES DIFFERENTES PARTIES DU NEEM	35
III.6.1. Les Feuilles	35
III.6.2. L'écorce	35
III.6.3. L'huile de Neem	36
III.7. PLANTE DE LA MEME FAMILLE QUE LE NEEM : MELIA AZEDARACH	38
IV. LE SYSTEME LACTOPEROXYDASE	40
IV.1. SYSTEME LACTOPEROXYDASE (LPS)	40
IV.1.1. La Lactoperoxydase	40
IV.1.2. Le Thiocyanate	41
IV.1.3. Le Peroxyde d'hydrogène	42
IV.2. EFFETS ANTIMICROBIENS DU LPS	42
V. LA LACTOFERRINE	46
V.1. LACTOFERRINE	46

V.1.1. Structure de la lactoferrine.....	46
V.1.2. Caractéristiques physico-chimiques de la Lactoferrine.....	47
V.1.3. Propriétés fonctionnelles.....	48
V.1.4. Activités biologiques.....	48
V.1.4.1. Activité antibactérienne	48
V.1.4.2. Activité antivirale	49
V.1.4.3. Activité antifongique	50
V.1.4.4. Activation de la réponse immunitaire	50
V.1.4.5. Activité anti-inflammatoire	50
V.1.4.6. Activité anti-oxydante	51
V.1.4.7. Activité anticancéreuse	51

Matériel et Méthodes

I. MATERIELS VEGETAL ET BIOLOGIQUE.....	53
I.1. MATERIEL VEGETAL.....	53
I.1.1. Les graines de Neem.....	53
I.1.2. Les bananes	53
I.2. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	53
II. ETUDE TECHNOLOGIQUES	56
II.1. EXTRACTION DES HUILES DE NEEM.....	56
II.1.1. Extraction par pression mécanique à froid	56
II.1.2. Extraction par Soxhlet.....	58
III. ÉTUDE DE LA COMPOSITION DES HUILES DE NEEM	59
III.1. DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES HUILES DE NEEM PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE (CPG).....	59
III.1.1. Principe :	59
III.1.2. Préparation des réactifs.....	60
III.2. ANALYSE DES COMPOSES VOLATILS DE L' HUILE DE NEEM.....	61
III.2.1. Objectif	61
III.2.2. Principe	61
III.2.3. Mode opératoire.....	61
III.2.4. Conditions	62
III.3. ANALYSE DES COMPOSES TRITERPENIQUES DE LA FRACTION INSAPONIFIABLE PAR HPLC-MS	62
III.3.1. Principe	62
III.3.2. Conditions	63
IV. MISE AU POINT DU SYSTEME LACTOPEROXYDASE	64
IV.1. OPTIMISATION DU SYSTEME : DETERMINATION DES DOSES DES DIFFERENTS CONSTITUANTS.....	64
IV.1.1. Objectif	64
IV.1.2. Préparation du réactif pour le dosage des ions OSCN-.....	65
IV.1.3. Dosage des ions hypothiocyanate (OSCN ⁻).....	65
V. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	68
V.1. LES MILIEUX DE CULTURE.....	68
V.1.1. Potato Dextrose Agar (PDA) (DIFCO, Le Pont de Claix, France).....	68
V.1.2. Potato Dextrose Broth (PDB).....	68
V.2. LES DILUANTS	68

V.2.1. Eau peptonée.....	68
V.2.2. Eau physiologique + Tween 80	68
V.3. INOCULUM.....	69
V.3.1. Inoculum utilisé pour l'étude la croissance des espèces fongiques en milieu de culture liquide PDB	69
V.3.2. Inoculum utilisé pour l'étude de la croissance des espèces fongiques en milieu de culture solide PDA.....	69
V.4. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DU SYSTEME LACTOPEROXYDASE ET DE LA LACTOFERRINE	70
V.4.1. Etude de l'activité antifongique du Système lactoperoxydase par la méthode de la biomasse	70
V.4.1.1. Etude de l'effet de différents Systèmes lactoperoxydase sur la croissance des espèces pathogènes fongiques	70
V.4.2. Etude de l'activité antifongique de la lactoferrine par turbidimétrie	71
V.4.2.1. Préparation de la lactoferrine.	71
V.4.2.2. Etude l'activité antifongique de la lactoferrine par turbidimétrie.....	71
V.5. ETUDE DE L'EFFET DE L'HUILE DE NEEM SUR LA CROISSANCE DES ESPECES PATHOGENES FONGIQUES.....	71
V.5.1. Effet des volatiles de l'huile de Neem sur la croissance des espèces pathogènes fongiques	71
V.5.2. Effet de l'incorporation d'huile de Neem dans le milieu de culture sur la croissance des souches pathogènes fongiques	72
VI. ETUDE DE L'ANTHRACNOSE DE BLESSURE DE BANANE.....	72

Résultats et Discussion

I. ETUDE DES POTENTIALITES D'UTILISATION DU SYSTEME LACTOPEROXYDASE	76
I.1. OPTIMISATION DU LPS	76
I.2. EFFET DU LPS SUR LA CROISSANCE DE DIFFERENTES ESPECES FONGIQUES PATHOGENES DE LA BANANE LORS DE CULTURE EN MILIEU LIQUIDE	80
II. ETUDE DES POTENTIALITES D'UTILISATION DE LA LACTOFERRINE ET DU BIOXEDA [®] CONTRE LES ESPECES FONGIQUES PATHOGENES DE LA BANANE	87
II.1. EFFET DE LA LF, DU LPS ET DU COUPLAGE LPS/LF SUR LA CROISSANCE DE COLLETOTRICHUM MUSAE ET DE FUSARIUM SP. .	87
II.2. EFFET DE TRAITEMENT AVEC LA FORMULATION ANTIFONGIQUE COMMERCIALE BIOXEDA [®] SUR LA CROISSANCE D'ESPECES FONGIQUES PATHOGENES DE LA BANANE	89
II.2.1. Effet des vapeurs de Bioxeda sur la croissance des pathogènes de la banane.....	89
II.2.2. Effet de la formulation Bioxeda [®] en incorporation directe dans de la gélose PDA sur la croissance des pathogènes de la banane	91
III. CARACTERISATION DE L'HUILE DE NEEM ET ETUDE DE SON POTENTIEL POUR LA LUTTE CONTRE LES SOUCHES FONGIQUES CAUSANT L'ANTHRACNOSE CHEZ LA BANANE	93
III. 1. EXTRACTION DES HUILES DE NEEM	93
III.1.1. Extraction par pression mécanique à froid	93
III.1.2. Extraction par Soxhlet.....	95
III.2. CARACTERISATION DES HUILES DE NEEM	96
III.2.1. Détermination de la composition en acides gras des huiles de Neem par Chromatographie Phase Gazeuse (CPG).....	96
^b Les résultats ont été exprimé en pourcentage par rapport à l'aire totale	100
III.2.2. Analyse des composés volatils par SPME.....	101
III.2.2.1. Comparaison d'huiles de Neem extraites par la méthode du Soxhlet et par première pression mécanique à froid.....	101
III.2.2.2. Comparaison d'huiles de Neem extraites par première pression mécanique à froid provenance de 3 origines géographiques différentes (Inde, Sénégal et Cameroun).....	107
III.2.3. Composition en composé triterpéniques d'huiles de Neem du Sénégal, Cameroun et d'Inde	108

III.3. ETUDE <i>IN VITRO</i> DES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DE L'HUILE DE NEEM SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES PATHOGENES DE LA BANANE	110
<i>III.3.1. Effet des composés volatils de l'huile de Neem sur la croissance de souches fongiques pathogènes de la banane</i>	110
III.3.1.1. Détermination de la dose de traitement	110
III.3.1.2. Effet des volatils de l'huile de Neem extraite par la méthode de Soxhlet et par pression mécanique à froid sur la croissance de souches pathogènes de la banane.....	113
<i>III. 3.2 Etude in vitro des propriétés antimicrobiennes de l'huile de Neem incorporée du milieu de culture PDA sur une collection de souches fongiques pathogènes de la banane</i>	115
III.3.2.1. Détermination de la dose de traitement	115
III.3.2.2. Incorporation d'huiles de Neem extraites par différentes méthodes (pression mécanique à froid et méthode de Soxhlet) dans du milieu de culture PDA	117
III.3.2.3. Etude des propriétés antifongiques d'huiles de graines de Neem d'Inde, du Cameroun et du Sénégal	119
IV. ETUDE DE L'ANTHRACNOSE DE BLESSURE	122

Conclusion

CONCLUSION GENERALE	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXES	153

Introduction

Introduction

L'état sanitaire de la banane dessert est une composante essentielle de sa qualité après récolte (Joas et Malisart, 2001). Cette qualité est détériorée par des maladies post récolte dont la plus importante est l'anthracnose (de Lapeyre, 1997). Elle est causée par *Colletotrichum musae* (Berk & M.A. Curtis) Arx. L'anthracnose se manifeste par des lésions sur le fruit, dues au développement du champignon (Julan, 2004), lésions de coloration brunes qui noircissent ensuite et se couvrent d'acervuli de couleur saumon comme les conidies de *Colletotrichum musae*.

L'anthracnose est traitée par des fongicides post récolte comme le Thiabendazole (Frossart, 1969 ; Rippon et Glennies-Holmes, 1973), l'imazalil (Krauss et Johanson, 2000) ou encore le bénomyl. Cependant, on observe une acquisition de résistance de *Colletotrichum musae* par rapport à ces fongicides. De ce fait, les doses de traitements sont augmentées pour avoir les effets escomptés (Hostachy *et al.*, 1990 ; Johanson et Blasquez, 1992). Un des enjeux actuels est donc de trouver des traitements adéquats permettant de conserver les fruits en bon état et d'éviter des problèmes environnementaux et écologiques. En effet l'augmentation des doses de traitement peut entraîner l'apparition de résidus de fongicides dans les produits commercialisés (Veneziano *et al.*, 2004) et nuire ainsi à la santé des consommateurs. La substitution des produits chimiques par des produits phytosanitaires d'origine végétale et/ou animale moins dangereux pour la santé humaine et l'environnement serait une solution très intéressante.

De nombreuses études montrent que des composés dérivés de certaines plantes et/ou animaux auraient une activité biologique contre certains organismes vivants pathogènes.

C'est le cas du système lactoperoxydase (LPS) rencontré dans le lait (Naidu, 2000). Ce système est composé de trois éléments qui sont l'enzyme lactoperoxydase, l'ion thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène. C'est la réaction entre le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène, catalysée par la lactoperoxydase qui donne le principe actif antimicrobien de ce système : l'ion hypothiocyanate (Jacob *et al.*, 2000). Des effets inhibiteurs de ce système ont été démontrés pour certaines bactéries, champignons et virus (Marshall et Reiter, 1980 ; de Wit et van Hooydonk, 1996 ; Wolfson et Sumner, 1993; Naidu, 2000).

Le but de ce travail est donc d'améliorer l'efficacité antifongique du système lactoperoxydase (LPS) sur la croissance de différentes souches fongiques pathogènes responsables de l'anthracnose chez la banane, la banane dessert étant la deuxième production mondiale fruitière après les agrumes (Pare et Loeillet, 1999). En effet des études antérieures ont montré

l'effet inhibiteur du LPS sur la croissance de ces souches pathogènes et l'intérêt d'optimiser cet effet. Pour se faire, d'autres substances ayant un potentiel antifongique seront étudiées dans le but de leur éventuel couplage avec le LPS.

Dans le premier chapitre de cette thèse seront présentés :

- Des généralités sur le bananier et la banane
- L'anthraxose, la maladie, l'agent causal
- Le Neem
- Le Système Lactoperoxydase
- La Lactoferrine

Dans le deuxième chapitre seront présentés le matériel et les méthodes utilisés.

Dans le troisième chapitre seront présentés les résultats.

Enfin, nous présenterons une conclusion générale ainsi que les perspectives de l'étude.

Revue de la littérature

I. LE BANANIER/LA BANANE

I.1. Taxonomie

La banane est le fruit du bananier, monocotylédone de l'ordre des *Scitaminales* et de la famille des *Musacées*, originaire d'Asie du Sud-est (Simmonds, 1962). Cette famille comprend deux genres, *Musa* et *Ensete* (Stover et Simmonds, 1987). Le genre *Musa* regroupe des bananiers du type séminifère ou sauvage et de type parthénocarpique ou cultivar. Les bananiers séminifères ou à graines sont diploïdes ($2n = 22$) et se multiplient végétativement ou par voie sexuée. Sur les 15 espèces décrites dans la section *Eumusa*, *M. acuminata* Colla (génome AAw) et *M. balbisiana* Colla (génome BBw) sont à l'origine des bananiers cultivés, ces derniers ayant été obtenus par réarrangement des génomes de ces deux espèces et augmentation de leur niveau de ploïdie (Cheesman, 1948) (figure 1).

Les bananiers sont différenciés en fonction de la qualité de leur fruit ; ils sont dits de type « dessert » lorsque la banane est riche en sucres ou « à cuire » si elle est plutôt riche en amidon. Les bananes exportées sont principalement des bananes « dessert », triploïdes de l'espèce *M. acuminata* (AAA) du sous-groupe des « Cavendish ». Les bananiers à cuire sont surtout des hybrides triploïdes avec deux génomes *acuminata* et un génome *balbisiana* (AAB), à l'instar des bananiers plantains (tableau I).

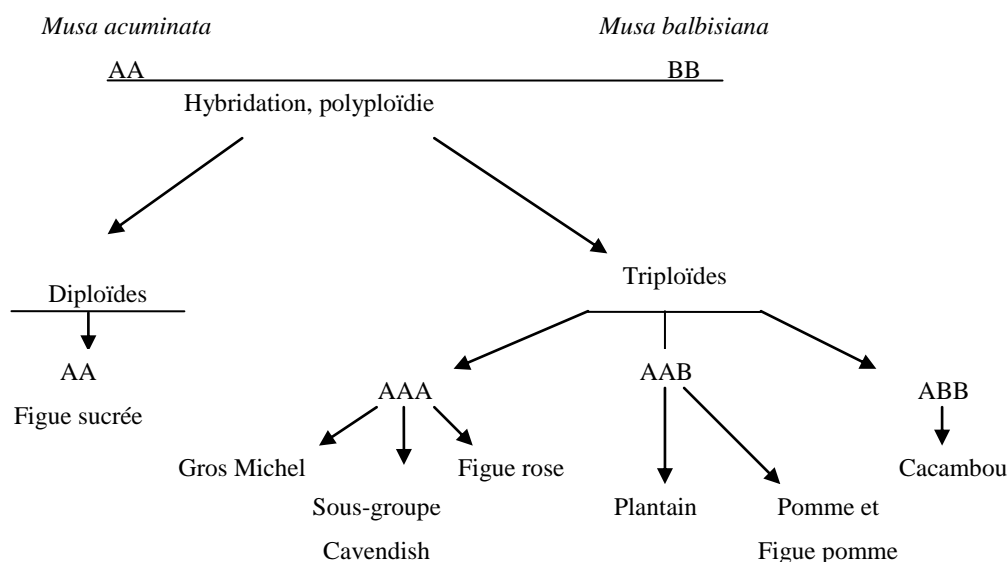


Figure 1 : Diagramme de la classification des cultivars à fruits parthénocarpiques (Lassoudière, 2007).

Tableau I : Principaux cultivars à fruits comestibles (Lassoudière, 2007).

Groupe	Sous-groupe	Cultivar	Type de fruit
AA	Sucrier	Pisang mas, Frayssinette, Figue sucrée	Dessert
	Pisang liln	Pisang liln	Dessert
	Pisang berangan	Pisang berangan	Dessert
	Lakatan	Lakatan	Dessert
AAA	Cavendish	Lacatan, Poyo, Williams, Grande Naine, Petite Naine	Dessert
	Gros Michel	Gros Michel, Cocos, Highgate	Dessert
	Figue rose	Figue rose, Figue rose verte	Dessert
	Lijugira	Intutu, Mujuba	A bière, à cuire
	Ibota	Yangambi km5	Dessert
AB	Ney Poovan	Safet Velchi, Sukari	Dessert acide
AAB	Figue pomme	Maça, Silk	Dessert acide
	Pome	Prata	Dessert acide
	Mysore	Pisang Ceylan	Dessert acide
	Pisang kelat	Pisang kelat	A cuire
	Pisang rajah	Pisang rajah bulu	A cuire
	Plantains	cultivars French	A cuire
	Plantains	cultivars Faux corne	A cuire
	Plantains	Cultivars Corne	A cuire
	Popoulou	Popoulou	A cuire
	Laknao	Laknao	A cuire
	Pisang nangka	Pisang nangka	A cuire
ABB	Bluggoe	Bluggoe, Matavia, Poteau, Cacambou	A cuire
	Pelepita	Pelepita	A cuire
	Pisang awak	Fougamou	Dessert
	Peyan	Peyan	A cuire

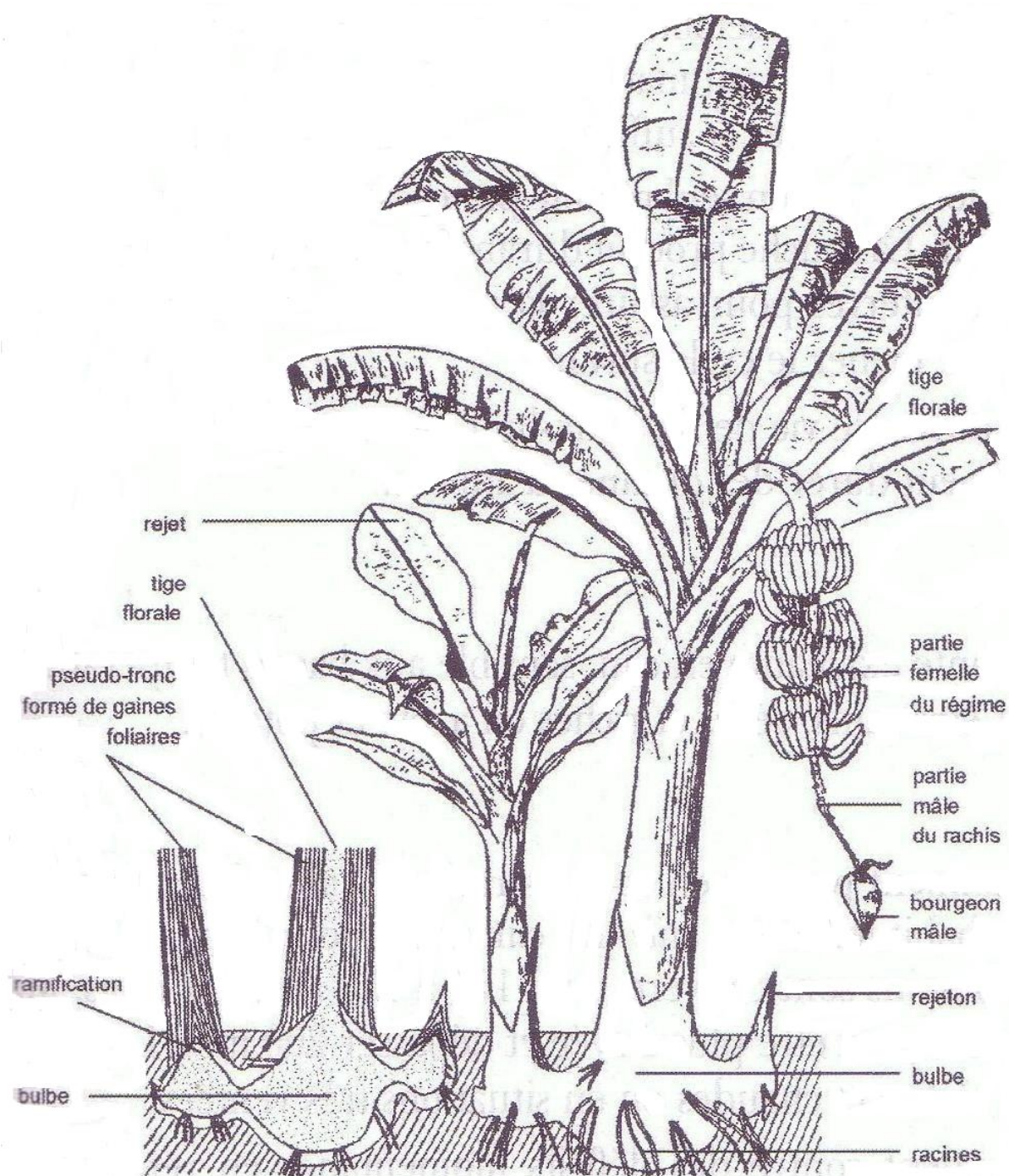


Figure 2 : Schéma de l'organisation du bananier (d'après Champion, 1963).

I.2. Morphologie de la plante

I.2.1. Appareil végétatif

Le bananier est une herbe géante monocotylédone ne possédant pas de tige végétative aérienne (figure 2). Sa tige vraie constitue un rhizome, bulbe ou souche qui est un organe souterrain, émettant des feuilles selon plusieurs hélices. Le rhizome est le centre vital du bananier, lieu de formation des racines, des feuilles et de l'inflorescence (Lassoudière, 2007).

Le pseudo-tronc est formé par l'emboîtement des gaines foliaires et peut mesurer de 1 à 8 mètres. Les feuilles sont émises par le méristème terminal de la tige vraie. Ainsi donc, les feuilles les plus jeunes se trouvent au sommet du pseudo-tronc et les plus vieilles à la base.

Elles sont constituées d'une gaine, se prolongent par un pétiole épais puis se terminent par une nervure centrale séparant un vaste limbe en deux parties sensiblement égales. Les feuilles ont une durée de vie de 70 à plus de 200 jours (Stover et Simmonds, 1987). Un bananier possède en général de 10 à 15 feuilles fonctionnelles à la floraison et de 5 à 10 feuilles à la récolte. Cependant, ce nombre varie en fonction des conditions environnementales et des maladies.

A la fin de la phase végétative, le méristème central induit la croissance et l'allongement de la tige vraie au cœur du pseudo-tronc, puis l'émergence de l'inflorescence. Le passage de l'état végétatif à l'état floral s'opère trois mois environ avant la sortie du bourgeon floral.

I.2.2. Description de l'inflorescence

L'inflorescence du bananier peut être verticale, pendante ou subhorizontale. Il s'agit d'une grappe complexe constituée d'une hampe florale ou rachis sur laquelle des grappes de fleurs ou « mains » sont arrangées selon trois hélices (de Lapeyre, 1999). Ces grappes prennent naissance à l'aisselle de bractées caduques de couleur pourpre, insérées sur un coussinet. Les fleurs, qu'elles soient mâles ou femelles, sont zygomorphes, de type 3 complexes.

Ces fleurs sont la plupart du temps caduques. Les fleurs femelles sont formées en premier ; elles ont un ovaire infère triloculaire, avec un style épais et court. Les 5 étamines sont réduites à des staminodes. L'ovaire augmente de volume sans fécondation et constitue le « doigt » ou banane.

Formé de la peau (péricarpe) et de la pulpe (endocarpe), le doigt est relié au coussinet par un pédicelle. Les fleurs mâles ont un ovaire réduit, avec un style filiforme et long. Les 5 étamines sont normales, mais ne produisent pas de pollen (Lassoudière, 2007).

I.3. Aspect agronomique

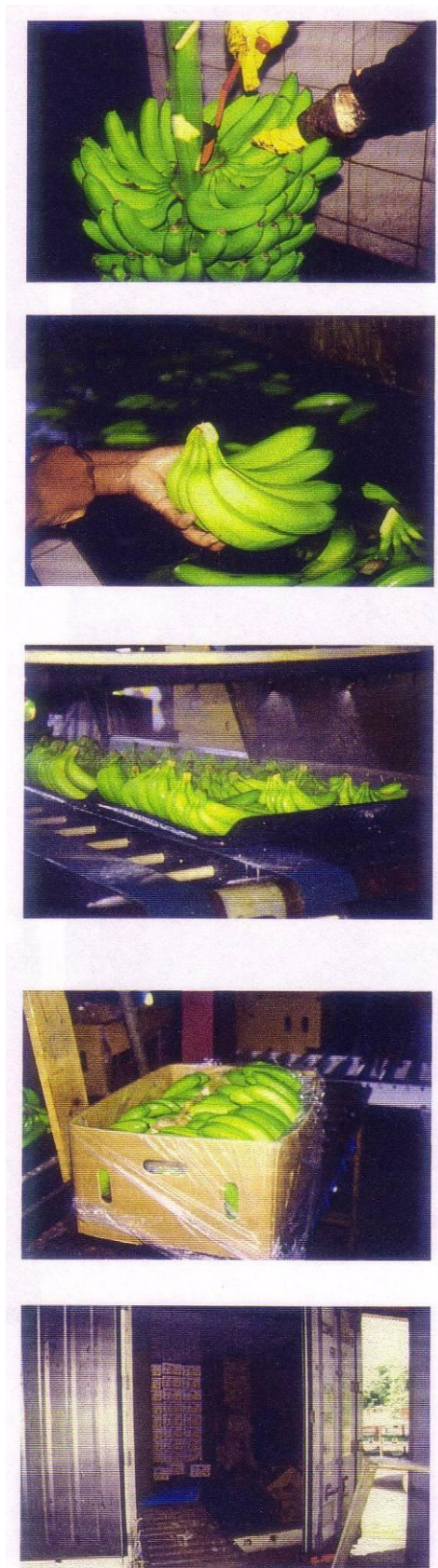
I.3.1. De la floraison à la récolte

La qualité de la banane s'acquiert depuis le champ. Aussi, certaines mesures et opérations sont indispensables pour obtenir un produit fini de bonne qualité.

Dès l'apparition de l'inflorescence, une première opération consiste à couper les feuilles qui pourraient gêner la sortie du régime ou l'abîmer par frottement ; cette opération s'appelle le dégagement (de Lapeyre, 1999).

Au stade floraison, le bourgeon mâle est sectionné. Puis les régimes sont gainés. La durée de croissance des fruits varie de 60 à 180 jours, selon les conditions climatiques. La récolte s'effectue lorsque le grade du doigt médian de la dernière main atteint au minimum 32 mm.

Actuellement, pour décider de la date de coupe, la majorité des planteurs utilisent la somme thermique couplée au grade (Lassoudière, 2007).



Découpe des mains de bananes

Des chocs entre les fruits des mains supérieures et ceux des inférieures sont fréquents

Découpe des bouquets

Cette manipulation peut engendrer diverses blessures sur le fruit (chocs contre le bac, coups de couteau, etc.)

Traitement fongicide des fruits par pulvérisation

Mise en carton

Cette manipulation est celle qui engendre le plus de blessure sur les fruits (chocs entre fruits, pliure de pédoncules, compression des fruits pour fermer le carton, etc.)

Figure 3 : Les différentes phases de découpe et de conditionnement des fruits à la station d'emballage. Chacune de ces manipulations peut engendrer une blessure du fruit (Chillet, 2003).

1.3.2. De la récolte au transport

La récolte des régimes de banane est manuelle. La hampe florale est sectionnée et le régime est déposé sur une « épaulière » (figure 3).

Les différentes étapes de la récolte à l’emballage des fruits sont les suivantes (de Lapeyre, 1999) :

- Elimination des pièces florales
- Découpe en main (dépatage)
- Découpe en bouquet
- Traitement fongicide
- Conditionnement des cartons
- Mise en container

Il est à noter que les régimes sectionnés doivent être emballés le jour même.

Les fongicides utilisés comme traitement sont le Tecto 20 S (200 mL/100 L) et le Baycor 300 EC (70 mL/100 L), le Bankit (100 mL/100 L), l’Imazalil (80 mL/100 L).

Après le conditionnement en carton, ceux-ci sont placés dans des containers qui sont eux-mêmes chargés dans des bateaux. Les containers sont réfrigérés à 13°C afin de ralentir l’activité métabolique des fruits.

1.4. La banane

En termes de production mondiale, la banane est le quatrième produit agricole après le riz, le blé et le maïs. Elle occupe le premier rang de la production fruitière, avec un peu plus de 100 millions de tonnes en 2003 (Lassoudière, 2007). Les bananes dessert (qui sont en majorité du sous-groupe Cavendish) représentent 56% de la production totale de banane. Trente pour cent de cette production sont exportés et cette commercialisation est une source vitale de revenus pour une quinzaine de pays dans le monde.

La banane est un fruit climactérique c’est-à-dire qu’elle présente un pic de respiration et une synthèse d’éthylène au moment de la maturation.

La vie d’un fruit climactérique se subdivise en quatre grandes phases :

- la phase de croissance et de développement ;
- la phase pré-climactérique ou durée de vie verte (DVV) qui, dans le cas de la banane d’exportation Cavendish, se déroule juste après la récolte du régime ;
- la crise climactérique ;
- la phase post-climactérique ou maturation.

Durant la phase de maturation de la banane, on observe des modifications de l'intensité respiratoire du fruit, dues à de nombreux processus biochimiques. Une échelle colorimétrique de la peau a été définie et est mondialement utilisée (avec quelques variantes) (figure 4) pour déterminer le degré de maturation des fruits.

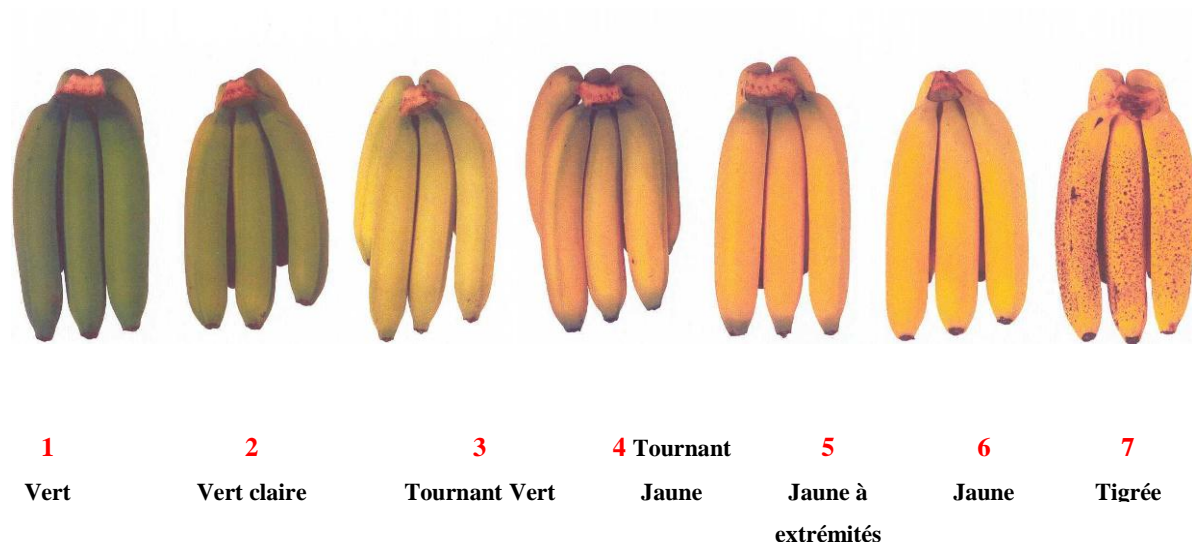


Figure 4 : Echelle colorimétrique standard pour les bananes dessert du sous-groupe Cavendish en fonction du stade de maturation (Source : Fruidor).

La principale maladie post récolte de la banane est l'anthracnose. Il existe deux types d'anthracnose : l'anthracnose de quiescence et l'anthracnose de blessure (Meredith, 1965).

La première se développe sur le fruit au cours de la maturation en formant des taches brunes à pourtour diffus qui peuvent devenir coalescentes pour former une nécrose plus large.

La seconde appelée "chancre", se développe sur des fruits encore verts à partir de lésions de la peau résultant de chocs occasionnés au cours des manipulations de récolte et d'emballage.

II. L'anthraxnose

II.1. L'Anthraxnose

L'anthraxnose est une altération des productions végétales par des champignons phytopathogènes appartenant au genre *Colletotrichum*. Ces champignons contaminent un grand nombre de fruits, entraînant leur nécrose et à terme, la putréfaction de récolte (Bailey, Jeger, 1992 ; Prusky *et al.*, 2000).

Les maladies causées par le genre *Colletotrichum* sont très répandues dans le monde. Cependant, les plus importantes économiquement sont celles qui attaquent les cultures de rente telles que le coton, le café, les haricots et les fruits tropicaux, comme les bananes, les mangues et les papayes (Waller, 1992). Pour nombre de ces productions, l'anthraxnose représente la principale maladie fongique ; c'est le cas pour la banane avec *C. musae* (de Lapeyre de Bellaire, 1997), la mangue, l'igname et de la papaye avec *C. gloeosporioides* (Vivekananthan *et al.*, 2004 ; Abang, 2003; Palhano *et al.*, 2004), la fraise avec *C. acutatum* (de los Santos García de Paredes, 2002). Les pertes provoquées par *Colletotrichum* se traduisent la plupart du temps par la réduction de la qualité et/ou du rendement de récolte.

Des conséquences économiques plus larges sont également liées à d'autres facteurs comprenant le retour faible sur l'investissement, et le coût des produits chimiques de traitement. Beaucoup de plantes d'exportation jouent un rôle crucial dans l'économie de petits pays en voie de développement et les pertes causées par la maladie peuvent avoir un impact significatif au niveau macro-économique (Waller, 1988). Au niveau micro-économique, les réductions de rendement ont un effet non négligeable sur la vie de beaucoup de personnes, dont la subsistance dépend des marchés locaux pour la nourriture. Ce genre microbien est présent dans de nombreuses parties du monde avec prépondérance sous les tropiques. Les maladies provoquées par les espèces appartenant à ce genre ont un impact négatif très important sur les productions végétales mondiales telles que les céréales, les légumineuses et les fruits d'exportation (Waller, 1992) ce qui entraîne des pertes économiques considérables.

La capacité de ces agents microbiens à causer des infections latentes ou de quiescences les placent parmi les principaux pathogènes post récolte des productions végétales.

Après la récolte des fruits, l'eau de lavage souvent recyclée mais non désinfectée est une source idéale de contamination. Le stockage des fruits dans un hangar à la température et l'humidité suffisantes favorise également la croissance des microorganismes pathogènes et permet à ces derniers de bien s'installer sur les fruits. Durant le transport vers les marchés, les conditions du milieu (températures et humidités élevées) favorisent également leur croissance.

II.2. Le genre *Colletotrichum*

II.2.1. Éléments de taxonomie

Le genre *Colletotrichum* appartient à l'ordre des *Mélanconiales* (conidies produites dans des acervules) de la classe des *Coelomycetes* (Hawksworth *et al.*, 1983). Les conidies des espèces du genre *Colletotrichum* sont unicellulaires, elliptiques ou falciformes, hyalines, sans appendices et sont produites apicalement sur des conidiophores, dans une gelée sporifère de couleur saumon à orange (von Arx, 1981). Il s'agit d'un genre dont la taxonomie est particulièrement complexe. Cette situation résulte principalement du fait que la dénomination a souvent été accordée en fonction de l'hôte sur lequel la souche de *Colletotrichum* a été isolée, alors que certaines espèces sont très polyphages.

Le tableau II donne la liste des différentes espèces de *Colletotrichum* responsables d'antracnose et les différentes plantes qu'elles infectent.

Tableau II : Liste non exhaustive des espèces du genre *Colletotrichum* et des plantes qu'ils infectent (adaptée de Skipp *et al.*, 1995).

Espèces	Hôtes
<i>Colletotrichum acutatum</i>	fraise, pomme, aubergine, café, avocat, tomate, papaye
<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Solanaceae</i> (tomate)
<i>Colletotrichum kahawe</i>	<i>Coffea</i> (café)
<i>Colletotrichum destructivum</i>	<i>Fabaceae</i>
<i>Colletotrichum fragariae</i>	<i>Fragaria</i> (fraise)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Manguier, igname, banana, avocat
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus</i> (Haricot)
<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Musa</i> (banana)
<i>Colletotrichum malvarum</i>	<i>Malvaceae</i>
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	<i>Cucurbitaceae</i> , <i>Asteraceae</i>
<i>Colletotrichum caudatum</i>	<i>Poaceae</i>
<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Solanaceae</i> (piment)
<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>Allium</i> (oignon)
<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Morus</i> (Mûre)
<i>Colletotrichum falcatum</i>	<i>Saccharum</i> (canne à sucre)
<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Poaceae</i> (maïs)
<i>Colletotrichum sublineolum</i>	<i>Poaceae</i> (Sorgho)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Fabaceae</i>

II.2.2. Morphotaxonomie

Un certain nombre d'études sur la variabilité des *Colletotrichum* isolés de fragments de bananiers ont été entreprises. Il est souvent difficile de comparer ces travaux qui ont été menés dans des conditions de culture différentes, à partir d'isolats provenant de différents

organes du bananier, et pour lesquels le pouvoir pathogène n'a pas toujours été caractérisé. Une synthèse de ces travaux est représentée dans le tableau III.

En dépit de la diversité des conditions d'étude, certaines tendances se dégagent de ces différents travaux. Aussi observe t on que les isolats pathogènes ont un mycélium peu développé et se caractérisent par une abondante sporulation qui confère à la culture un aspect orange. Néanmoins, les isolats pathogènes n'ont pas toujours ce morphotype. Ces isolats sont aussi signalés comme ayant une croissance mycélienne rapide et ils correspondent à la description de *C. musae* définie comme suit (de Lapeyre, 1999) :

- Colonies avec un mycélium ras ou cotonneux, blanc, devenant gris avec l'âge. La couleur des cultures est souvent ocre à orangée, en fonction de l'importance de la sporulation. Les spores sont produites dans des masses sporifères, de couleur saumonée, qui sont nombreuses et réparties sur toute la culture. Des structures stromatiques noires, sont aussi souvent présentes et réparties sur toute la culture.
- Les conidies sont unicellulaires, hyalines, ovales à elliptiques. Leur contenu est granuleux, mais l'on observe un point non granuleux au centre de la conidie, souvent accolé à l'une des deux parois de la spore (figure 5). Les dimensions sont variables mais restent dans une gamme de 11-17 x 3-5,5 µm.

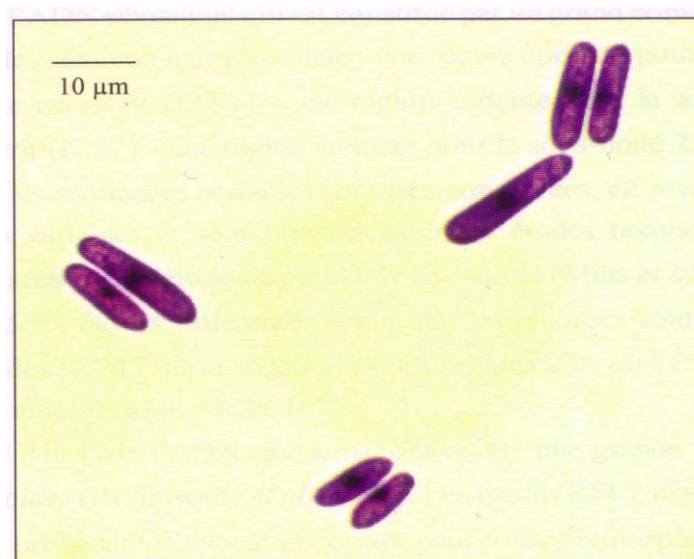
Les appressoria (9-13 x 9-11,5 µm) sont plus ou moins fortement lobés.

Tableau III : Données bibliographiques sur certaines caractéristiques culturales et pathogéniques de différents *Colletotrichum sp* isolés de bananier (de Lapeyre, 1999)

	Ashby (1931)	Simmonds & Mitchell (1940)	Kaiser & Lukezic (1966)	Quimio (1976)	Yang & Chuang (1991)	Wijesundera (1994)
Pays	Trinidad, Ceylan, Inde	Australie	Honduras	Philippines	Taiwan	Ceylan
Organes sources	Pédoncules, fruits, feuilles	Pédoncules, fruits, feuilles	Couronnes, fruits, feuilles, bractées	Lésions sur fruits	Lésions sur fruits	Lésions d'antracnose
Nombre d'isolats étudiés	35	500-600	127/conidies 19/ascospores	10 (issus de 4 clones)	66	5 (issus de 5 clones)
Conditions de culture	PDA	PDA, Dox Agar, Malt Agar, avoine Agar	PDA	Milieu de Cook et de Czapeck, 30 °C. Lumière variable	PDA-25 °C, à l'obscurité	PDA, Czapeck-Dox, Malt. 25°C
Nombre de morphotypes	3	3	3	Non décrits	3	Non décrits
Description	1. 66% mycélium aérien peu développé. Nombreuses acervules réparties sur toute la culture 2. 22% Séquence allant vers un mycélium de plus en plus fourni et une sporulation de moins en moins importante 3. 12% Présence de périthèces. Mycélium fourni gris-blanc. Faible sporulation	A. Le plus commun : correspondant au groupe 1 de Ashby B. Mycélium très ras et acervules très nombreuses sur toute la surface du milieu. C. Mycélium abondant et gris. Faible sporulation. Croissance lente	1. 23% des isolats conidiens. Type orange. Mycélium aérien blanc, sporulation abondante. 2. 35% des isolats conidiens. Type orange-noir. Sporulation abondante. 3. 42% des isolats conidiens. Type gris-noir. Faible sporulation	Des différences morphologiques sont signalées quant à la croissance mycélienne (un isolat a une croissance très faible) et l'intensité de la sporulation qui est toujours plus élevée en lumière continue ou alternée	A. 53% Colonies oranges, mycélium ras, blanc. Sporulation abondante. B. 29% Colonies roses, mycélium gris clair, sporulation moins abondante. Sclérotés. C. 18% Colonies gris-noir. Mycélium gris. Sporulation moins abondante.	La croissance mycélienne est rapide et la sporulation abondante
Forme parfaite	Présente dans le groupe 3	Rare (non décrite)	18 de type 3 ; 1 de type 2	Non signalée	Absente	Non signalée
Pouvoir pathogène	Non présenté (isolats du groupe 3 seraient moins pathogènes)	Tous les isolats produisent des lésions sur les pédoncules	Sur couronnes type 1 : 100 % Type 2 : 63% Type 3 : 46%	Tous les isolats formes des lésions sur fruits mûrs	Tous les isolats produisent des lésions sur fruits	Non étudié



Coupe transversale dans une acervule



Conidies colorées par le bleu trypan

Figure 5 : Acervules et conidies de *Colletotrichum musae* (source : de Lapeyre, 1999).

II.2.3. Spécificité parasitaire

Un certain nombre de travaux ont été effectués pour caractériser le pouvoir pathogène des souches de *Colletotrichum* isolées sur banane et sur d'autres hôtes (tableaux IV et V). Si *C. musae* apparaît comme relativement spécifique du bananier, en revanche, certains isolats de *C. gloeosporioides* provenant de papaye ou d'avocat peuvent être pathogènes sur banane, même en absence de blessures.

Tableau IV : Evolution du pouvoir pathogène d'isolats de *Colletotrichum sp*/banane sur différents hôtes (de Lapeyre, 1999).

Hôte	Muller (1962)	Le Grand-Pernot & Trocne (1974)	Lourd (1982)	Nakamura et al. (1991)	Yang & Chuang (1994)	Hayden et al. (1994)
Melon		- (plantules)		- (B et NB)		
Mangue				- (B et NB)	- (B)	- (NB)
Papaye				- (B et NB)	- (B)	- (NB)
<i>Syzygium samarangense</i>				- (B et NB)	- (B)	
Pomme	+ (B) Fruit mûr - (B) Fruits vert					
Carambole					- (B)	- (NB)
Lychee						- (NB)
Fraise						- (NB)
Kaki				- (B et NB)		
Avocat						- (NB)
Aubergine			- (B)			
Goyave					+ (B)	

B = Fruits blessés, NB = fruits non blessés

+ = interaction pathogène, - = interaction non pathogène

Tableau V : Evaluation du pouvoir pathogène de *Colletotrichum sp*, isolés à partir de différents fruits, sur banane (de Lapeyre, 1999)

Hôte d'origine	Le Grand-Pernot & Trocne (1974)	Nakamura et al. (1991)	Yang & Chuang (1994)	Hayden et al. (1994)
Melon	+ (B)			
Mangue		- (B et NB)	- (B)	- (NB)
Papaye		+/- (B et NB)	+ (B)	+ (NB)
<i>Syzygium samarangense</i>		+/- (B et NB)	+ (B)	
Carambole			- (B)	+/- (NB)
Lychee				+/- (NB)
Fraise				- (NB)
Avocat		+/- (B)		+ (NB)
Goyave			- (B)	
<i>Annona squamosa</i>			- (B)	

B = Fruits blessés, NB = fruits non blessés

+ = interaction pathogène, - = interaction non pathogène

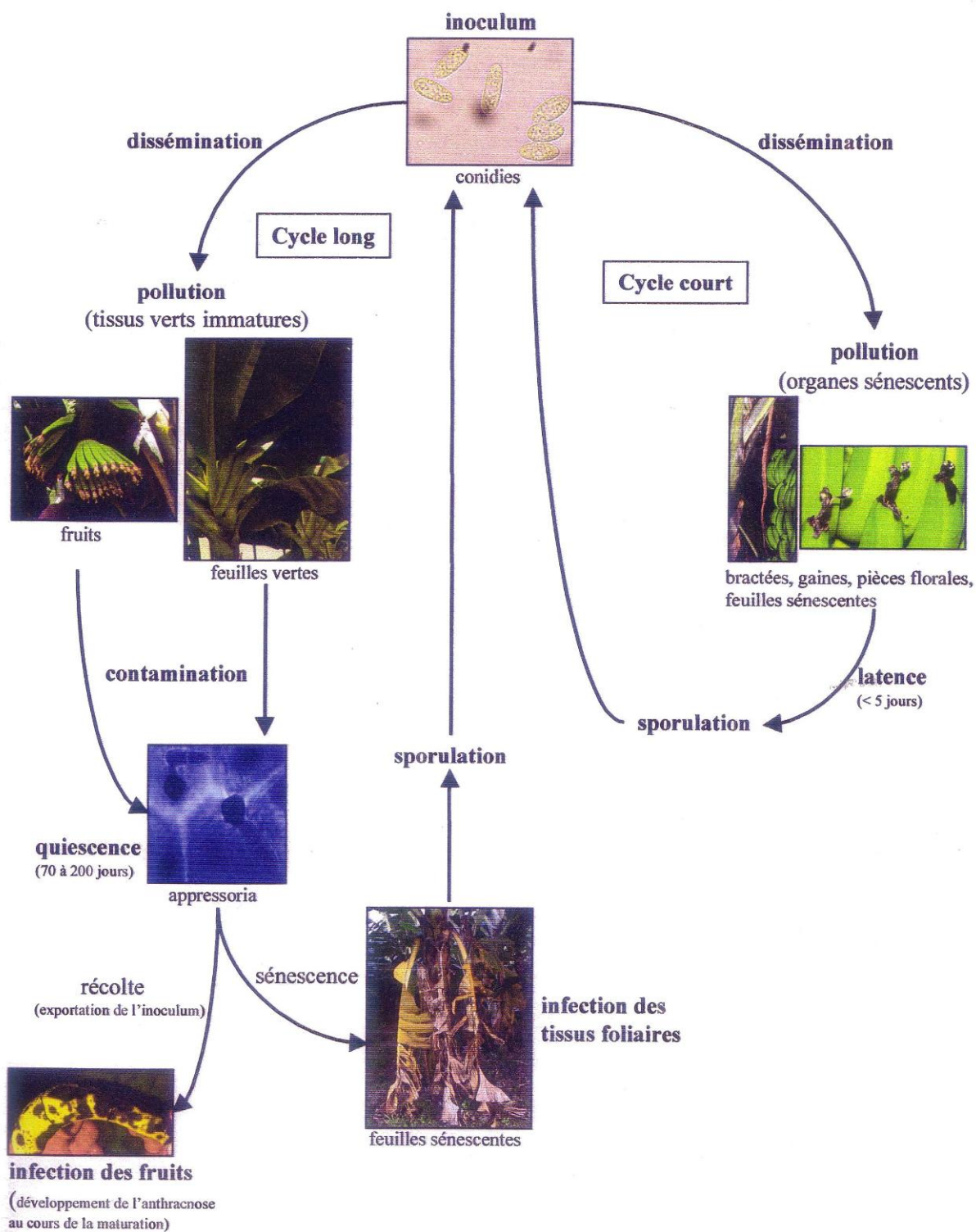


Figure 6 : Cycle infectieux de l'anthracnose du bananier d'après de Lapeyre (1999).

II.3. L'épidémiologie des maladies provoquées par les souches du genre *Colletotrichum*

Chez les fruits, l'antracnose provoque des lésions qui se traduisent par des colorations brunes qui noircissent ensuite et se couvrent d'acervuli de couleur saumon comme les conidies de *C. musae*. Les symptômes graves sont généralement visibles quand le fruit devient trop mûr. Les lésions sont noires. Au fur et à mesure que les fruits mûrissent les lésions s'agrandissent et la pulpe des fruits peut être envahie entraînant une putréfaction aqueuse (Meredith, 1965).

L'antracnose de fruit mûr commence par une infection latente du fruit vert au champ (Muirhead et Deverall, 1981) où la plupart des microorganismes pathogènes coexistent dans les écosystèmes des pièces florales et des feuilles. L'infection peut aussi conduire à la pénétration des souches pathogènes dans les fruits quand ceux-ci sont détachés de la tige à la récolte (figure 6). Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans le développement des maladies dues au genre *Colletotrichum*. Par exemple, Lenné (1992) a rapporté que les conditions optimales pour le développement des espèces les plus importantes du genre *Colletotrichum* affectant des légumineuses étaient des températures de 18 à 28°C avec des humidités relatives de 90%. En général, le facteur primaire influençant le développement de la maladie est la disponibilité en eau, car une humidité élevée est essentielle pour la sporulation de la plupart des espèces de *Colletotrichum*, raison pour laquelle ces maladies sont plus importantes sous les tropiques. Néanmoins, souvent d'autres facteurs tels que la surface foliaire, l'humidité, la lumière et la compétition de la flore microbienne interagissent avec la température (Rotem *et al.*, 1978 ; Royle et Butler, 1986). Cependant, au niveau des espèces tropicales telles que *C. gloeosporioides*, le temps d'exposition à l'humidité extérieure semble avoir une influence directe sur la germination des conidies, l'infection et la croissance.

Les stratégies d'infection des espèces du genre *Colletotrichum*.

La dispersion et l'adhérence des spores

Dans beaucoup d'espèces, les conidies et les ascospores sont incluses dans une matrice mucilagineuse hydrophile (Nicholson et Moraes, 1980 ; McRae et Stevens, 1990), constituée la plupart du temps par des polysaccharides et des glycoprotéines (Ramadoss *et al.*, 1985 ; Louis et Cooke, 1985). Ces matrices sont aisément solubles dans l'eau, avec des spores libérées et dispersées par l'action de l'eau libre (habituellement la pluie). La matrice peut avoir plusieurs rôles :

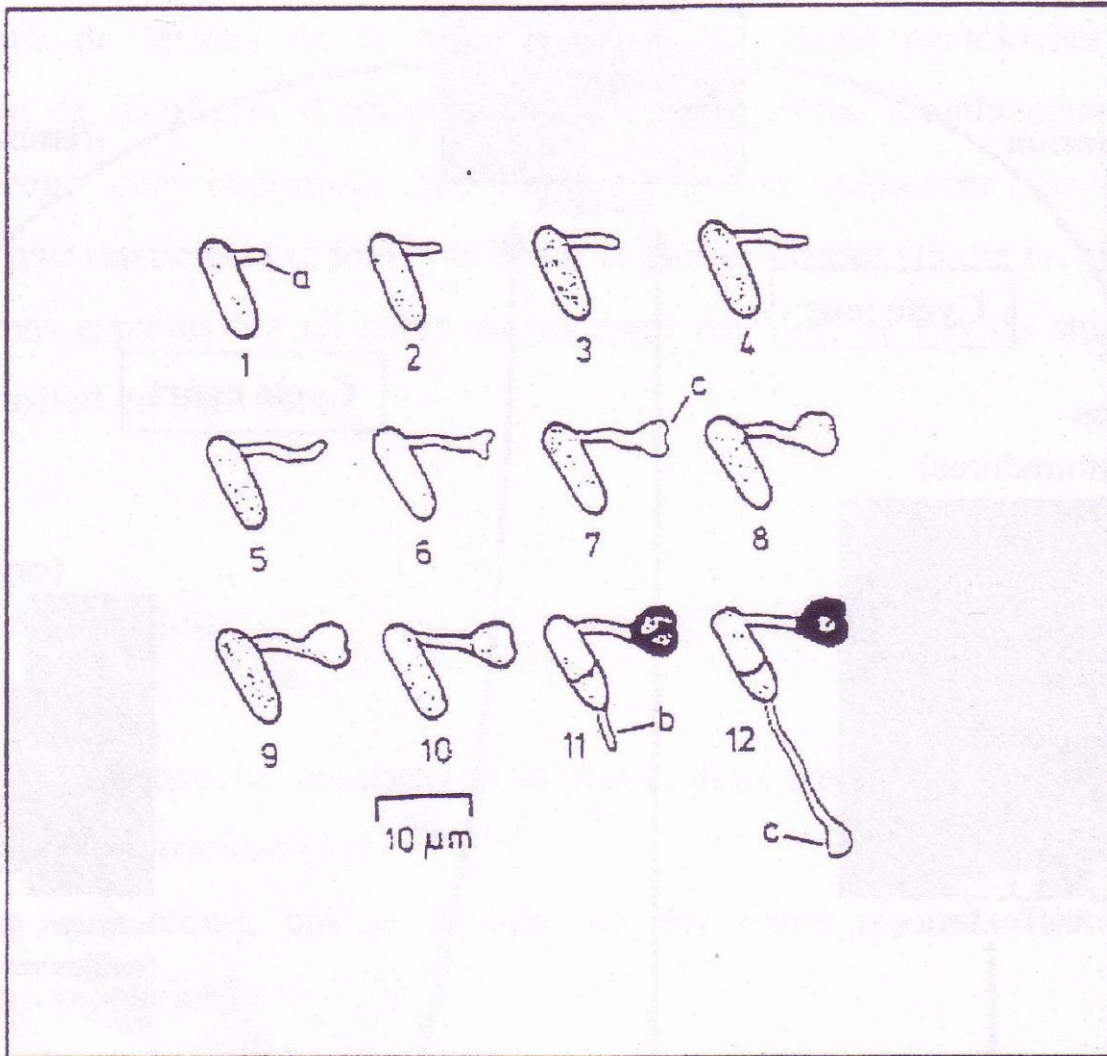
- Maintien de la viabilité des conidies dans des conditions défavorables telles que les températures extrêmes, les lumières UV et les humidités trop basses (Nicholson et Moraes, 1980 ; Nicholson *et al.*, 1986 ; Louis *et al.*, 1985), et protection des spores contre les substances toxiques produites dans les tissus infectés pendant le développement de lésion (Nicholson et Moraes, 1980 ; Nicholson *et al.*, 1986).
- Inhibition de la germination des conidies, s'assurant de ce fait que les conidies ne germent pas jusqu'à ce qu'elles soient dispersées de l'acervulus (Louis et Cooke, 1985 ; Seebach *et al.*, 1989 ; Leite et Nicholson, 1992).

L'infection par *Colletotrichum spp.* est effective lorsqu'on observe l'attachement des propagules fongiques sur la surface de la plante (Hamer *et al.*, 1988 ; Nicholson et Epstein, 1991). Des études ont prouvé que les conidies de *Colletotrichum spp.* Adhèrent facilement à un large éventail de plantes et de surfaces artificielles, y compris la cellophane, le polystyrène, le polycarbonate et le verre (Young et Kaus, 1984 ; Mercure *et al.*, 1994a, b 1995 ; Sela-Buurlage *et al.*, 1991), suggérant que l'adhérence soit non spécifique. D'autres travaux ont permis de démontrer que les parois de conidies germées ou non de *Colletotrichum spp.* sont enduites d'une substance fibrillaire ou « manteau de spores » qui commande l'adhérence du pathogène sur les cellules hôtes (Jones *et al.*, 1995 ; Mercure *et al.*, 1995).

Modes de pénétration

Les mécanismes de pénétration de *Colletotrichum* ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Il en résulte que plusieurs modes de pénétration sont possibles : par les ouvertures naturelles des plantes (stomates, blessures) et par pénétration directe au niveau de la cuticule. La pénétration directe est le moyen le plus commun de pénétration des tissus (Bailey *et al.*, 1992). Il y a peu d'exemples de pénétration par les stomates dans la littérature, cependant, celle-ci a été rapportée pour l'infection des feuilles de l'arbre à caoutchouc (*Hevea brasiliensis*) par *C. gloeosporioides* (Sénéchal *et al.*, 1987). L'infection par des blessures, en

général peu commune, n'est pas habituellement un préalable à l'infection. Cependant, pour quelques cas spécifiques comme l'anthracnose de couronne et celle des doigts de la banane, l'infection par les blessures est la plus répandue (Krantz *et al.*, 1978 ; Agrios, 1988). Van der Bruggen et Maraite (1987) et Van der Bruggen *et al.* (1990) ont prouvé que les tiges intactes de manioc étaient résistantes à *C. gloeosporioides*, car la localisation de ce pathogène est restreinte à la couche épidermique. Cependant, après l'attaque par un insecte, le microorganisme pathogène peut coloniser le tissu endommagé, et les lésions de sporulation se forment rapidement. L'utilisation d'une aiguille chaude pour simuler les effets d'une buse d'insecte a un effet semblable. On a cependant constaté que dans ni l'un ni l'autre de ces exemples la blessure n'était l'emplacement initial de la pénétration. Le pathogène a au départ gagné l'entrée du tissu par la cuticule, la croissance est restée limitée à la couche épidermique, et il ne pouvait coloniser les tissus qu'après la mort des tissus fondamentaux. L'anthracnose des fruits tropicaux qui impliquent une période de latence, peut avoir des analogies de développement étroites avec les événements décrits ci-dessus. Dans ce cas le pathogène reste localisé dans la couche épidermique sous une forme latente ou dormante jusqu'à la maturation du fruit, quand les changements physiologiques stimulent le développement du pathogène (Brown, 1975 ; Prusky et Plumbly, 1992). La figure 7 présente la germination de conidie de *C. musae* avec formation d'appressoria. On a observé des exemples de pénétration sans formation d'appressoria dans le cas de *C. gloeosporioides* sur *Aeschynomene virginica* (Fabaceae), *Carica papaya* (papaye) et des *Citrus spp.* (agrumes), et des *C. musae* sur des *Musa spp.* (Brown, 1975 ; TeBeest *et al.*, 1978 ; Muirhead et Deverall, 1981 ; Chau et Alvarez, 1983, Porto *et al.*, 1988).



(a) premier tube germinatif, (b) deuxième tube germinatif, (c) appressorium.

Figure 7 : Germination et formation d'un appressorium à partir d'une conidie de *Colletotrichum musae*, d'après Swinburnes (1976).




Pourriture de couronnes	Anthracnose de blessure ou chancre	Anthracnose de quiescence
		
<i>Colletotrichum musae</i> <i>Fusarium spp</i>	<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Colletotrichum musae</i>

Figure 8 : Différentes altérations associées à *Colletotrichum musae*

II.4. Les différentes altérations associées à *Colletotrichum musae*

L'anthracnose est la principale maladie causée par *Colletotrichum musae* chez la banane et aussi la principale maladie post récolte de la banane (Wardlaw, 1961). Cependant, l'anthracnose n'est pas la seule maladie causée par ce pathogène sur la banane. Il existe aussi la pourriture de couronne.

II.4.1. L'anthracnose des fruits

Il existe deux formes d'anthracnose : l'anthracnose de quiescence et l'anthracnose de blessure (figure 8). L'anthracnose de quiescence se développe au cours de la maturation du fruit. Elle se caractérise par l'apparition de petites taches brunes. La pourriture se développe dans un premier temps sur la peau du fruit et ensuite évolue jusque dans la pulpe. L'anthracnose de blessure ou chancre se développe sur les fruits encore verts à partir de lésions occasionnées par des chocs au cours des manipulations post récolte des fruits.

II.4.2. Les pourritures de la couronne (crown rot)

Il s'agit d'une maladie que l'on retrouve dans toutes les zones de production de banane. Avec l'anthracnose, c'est l'une des principales maladies de la banane (Krauss et Johanson, 2000). La pourriture de couronnes est apparue au début des années 1960 avec le développement du conditionnement des fruits en mains. Effet, avant cette date, les régimes de bananes étaient exportés entiers. Des pourritures apparaissaient sur la couronne fraîchement coupée. Elle se manifeste par un ramollissement des tissus réunissant les pédoncules des fruits entre eux et s'accompagne d'un noircissement de ces derniers. De très nombreuses études ont été menées pour essayer de comprendre la cause de cette maladie. Il en est ressorti que la pourriture de couronne est due à un complexe microbien qui comprend de nombreuses espèces fongiques et bactériennes. Toutefois, les pathogènes retrouvés le plus fréquemment et dont le pouvoir pathogène n'est pas remis en cause, sont *Colletotrichum musae* et des espèces de *Fusarium*. Le tableau VI donne le nom de différentes souches fongiques causant la pourriture de couronne chez la banane.

Tableau VI : Données bibliographiques sur les différentes espèces fongiques isolées à partir des pourritures de couronnes, dans différentes zones de production (de Lapeyre, 1999)

Pays	<i>Colletotrichum musae et spp</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Lasiodiplodia theobroma</i>	<i>Verticillium theobroma</i>	<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Nigrospora spherica</i>	<i>Cephalosporium spp</i>
Honduras	Lukezic <i>et al.</i> , 1967 (3%)	Lukezic <i>et al.</i> , 1967 (>80%)	Lukezic <i>et al.</i> , 1967 (12%)	Lukezic <i>et al.</i> , 1967 (81%)			Lukezic <i>et al.</i> , 1967 (93%)
Amérique centrale et du sud	Green et Goos, 1963 (fréquent) Marin <i>et al.</i> , 1996 (0-10%)	Green et Goos, 1963 (fréquent) Marin <i>et al.</i> , 1996 (23-78%)	Green et Goos, 1963 (rare)	Green et Goos, 1963 (fréquent)	Marin <i>et al.</i> , 1996 (0-19%)	Green et Goos, 1963 (rare)	Marin <i>et al.</i> , 1996 (0-8%)
Windward Islands	Wallbridge et Pinegar, 1975 (23-33%) Griffiee et Burden, 1976 (36%) Wallbridge, 1981 (24%) Johanson et Blasquez, 1992 (26-44%)	Wallbridge et Pinegar, 1975 (55-60%) Griffiee et Burden, 1976 (34%) Wallbridge, 1981 (30%) Johanson et Blasquez, 1992 (13-44 %)	Griffiee et Burden, 1976 (2%) Wallbridge, 1981 (2%) Johanson et Blasquez, 1992 (9-13%)	Wallbridge et Pinegar, 1975 (5-7%) Griffiee et Burden, 1976 (8%) Wallbridge, 1981 (3%) Johanson et Blasquez, 1992 (4-18%)	Wallbridge et Pinegar, 1975 (5%) Wallbridge, 1981 (2%) Johanson et Blasquez, 1992 (0-10%)	Griffiee et Burden, 1976 (<1%) Wallbridge, 1981 (<1%) Johanson et Blasquez, 1992 (24-26%)	Wallbridge, 1981 (2%) Johanson et Blasquez, 1992 (0-10%)
Jamaïque	Shillingford, 1976 (11%)	Shillingford, 1976 (56%)	Shillingford, 1976 (3%)	Shillingford, 1976 (13%)		Shillingford, 1976 (1%)	Shillingford, 1976 (3%)
Nigéria	Ogundero, 1987 (27%)	Ogundero, 1987 (20%)	Ogundero, 1987 (26%)	Ogundero, 1987 (2%)			
Somalie, Windwards, Guatemala	Mesturino et Ragazzi, 1988 (38%)	Mesturino et Ragazzi, 1988 (35%)		Mesturino et Ragazzi, 1988 (2%)			Mesturino et Ragazzi, 1988 (4%)

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux fréquences d'isolement lorsqu'elles ont été communiquées par les auteurs

II.5. Les différents moyens de lutte actuels contre les maladies causées par *Colletotrichum musae*

Le contrôle des maladies causées par *Colletotrichum musae* doit se faire dès le champ (Stover, 1972), bien que les maladies s'expriment après la récolte. Néanmoins, nous savons que ce pathogène est déjà présent au champ d'où cette précaution. Aussi les moyens de lutte existant sont subdivisés en moyens de lutte avant et après récolte.

II.5.1. les moyens de lutte avant la récolte

Avant la récolte, les moyens de lutte consistent en l'entretien des plantations et l'utilisation de fongicides pré-récoltes. En effet, dans les bananeraies, les feuilles sénescentes des bananiers sont éliminées régulièrement car d'après certains auteurs, les pathogènes fongiques étant saprophytes, peuvent se développer sur les feuilles en décomposition (Meredith, 1962). Il faut également prendre les mêmes précautions pour les pièces florales. En somme, une bananeraie bien entretenue permet de réduire les contaminations au champ.

Un autre moyen de lutte est l'utilisation de fongicides systémiques au champ pour lutter contre l'anthracnose (de Lapeyre, 1999).

II.5.2. les moyens de lutte après la récolte

- Lutte chimique

C'est la méthode de lutte la plus utilisée. Les bananes sont traitées, après récolte, par application de fongicides. Cette application se fait par trempage ou pulvérisation, (Khan *et al.*, 2000). Les premiers fongicides à faire leur apparition sur le marché, à partir des années 1970, sont les fongicides systémiques. Ils permettaient de contrôler les maladies dues à *Colletotrichum musae*. Les produits à mode d'action antimétabolique, principalement le bénomyl et le thiabendazole, ont fait preuve d'une grande efficacité (de Lapeyre, 1999). Cependant, des souches de *Colletotrichum musae* résistantes à ces fongicides se sont développées. On est donc passé à des fongicides inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol comme l'imazalil et le bitertanol.

- Précaution dans la manipulation des fruits

Il est important d'éviter tout choc des fruits qui pourraient engendrer des blessures ou des meurtrissures pouvant amplifier l'extension des lésions. La qualité des cartons d'emballage et leur tenue au cours du transport est aussi importante pour limiter les chocs. De plus, la crise climactérique constitue le point de départ du développement des lésions d'anthracnose. Aussi des mesures sont prises pour retarder cette évolution réversible des fruits vers un processus de

maturation (de Lapeyre, 1999). Pour se faire, après le conditionnement des fruits en cartons, les fruits doivent être réfrigérés le plus rapidement possible à la température de 13°C, afin de ralentir leur activité métabolique et celle des pathogènes.

- **Traitements physiques**

Il s'agit de traitement à l'eau chaude, aux rayons gamma et UV.

De Costa et Erabadupitiya (2005), travaillant sur contrôle des maladies postrécoltes de la banane, ont montré qu'un traitement des bananes à 50°C pendant 3 min était les conditions optimales pour réduire de manière significative la pourriture de couronne. Des températures supérieures à 50°C altèrent la coloration finale des bananes après mûrissement et un temps de contact supérieur à 5 min, réduit la valeur du °Brix. Ce sont des résultats prometteurs pour la conservation des bananes après la récolte, cependant, à l'heure actuelle, ces résultats n'ont été suivis d'aucun développement commercial contrairement à ce qui est réalisé aujourd'hui pour d'autres fruits tropicaux comme la mangue (Coastes *et al.*, 1993 ; Spalding et Reeder, 1978) ou la papaye (Nishijima *et al.*, 1992 ; Couey *et al.*, 1984). De Costa et Erabadupitiya (2005) ont également couplé le traitement à l'eau chaude et l'utilisation de microorganismes antagonistes (bactéries) pour augmenter l'efficacité de leur traitement contre la pourriture de couronne.

En ce qui concerne le traitement aux rayons gamma, Kanapathipillai *et al.* (1987) signalent que le traitement aux rayons gamma (pendant 38 min à la dose de 4 kGy) inhibent la germination, la formation d'appressoria de *Colletotrichum musae* et tout le développement fongique à la surface de fragments de fruits. Toutefois, les effets des rayonnements sur le fruit entier n'ont pas été étudiés.

- **Lutte génétique**

Très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la sensibilité des différents clones de bananiers vis-à-vis des maladies postrécoltes. Cela est d'autant plus difficiles que la culture de la banane dessert pour l'exportation ne repose que sur une faible gamme variétale. En effet, tous les clones appartiennent au sous-groupe Cavendish (Bakry *et al.*, 1997) qui sont des espèces triploïdes qui sont généralement stériles.

- **Lutte biologique**

Un certain nombre de microorganismes inhibent la croissance mycélienne et la germination de *Colletotrichum musae in vitro*. Ce sont des levures, des bactéries et d'autres champignons, ce sont des microorganismes utilisables pour un contrôle biologique. De Costa et Erabadupitiya (2005) ont montré, *in vitro*, la réduction significative de la pourriture de couronnes par complexe *Burkholderia cepacia*. De plus Postmaster *et al.* (1997) ont montré

que des levures avaient une action fortement antagoniste seulement si elles étaient installées 24 à 48 h avant l'inoculation des feuilles de bananier par des conidies de *Colletotrichum muase*.

Nous pouvons aussi noter l'effet de substances naturelles comme les huiles essentielles ou des extraits de plantes sur les maladies postrécoltes de la banane. En effet, Win *et al.* (2007) ont montré que le cinnamome réduisait significativement la pourriture de couronne et n'avait pas d'effet négatif sur la qualité postrécolte des bananes. De plus des sociétés comme Xeda International ont mis au point des enrobages et pesticides naturelles à base d'eugénol pour la conservation des fruits comme la pêche. Thai Thi et Ducamp (2008), ont montré que les produits Xedabio[®] (à base de carnauba) et Bioxeda[®] (à base d'eugénol) à hauteur de 2% de Xeda international[®] réduisaient tous les deux la perte de poids des mangues traitées.



(a)



(b)

Figure 9 : *Azadirachta indica* (Neem) :
L'arbre (a) (source : Architecture et Développement), Les fruits et les feuilles (b)
(source : www.dkimages.com/.../Melia-azadirachta-3.html)

III. LE NEEM

III.1. Le Neem

Le Neem a été décrit pour la première fois en 1830 par de Jussieu. Sa taxonomie est la suivante :

Ordre : Rutales

Sous-ordre : *Rutinae*

Famille : *Meliaceae*

Sous-famille : *Melioideae*

Tribu : *Melieae*

Genre : *Azadirachta*

Espèce : *indica*

III.2. La plante

Le Neem ou *Azadirachta indica* est un arbre de la famille des *Méliaceae*, originaire d'Inde. Il est peut être la plus utilisée des plantes médicinales en Inde (Biswas *et al.*, 2002).

Le Neem est un arbre sauvage dont la croissance est rapide et la durée de vie très longue puisqu'il peut vivre plus de deux siècles. C'est un grand arbre, aux branches longues et étalées, qui peut atteindre 30 mètres de haut. Son système racinaire s'étend de façon importante en largeur et en profondeur. Ses feuilles sont légèrement dentelées, pennées, et de couleur verte foncée (figure 9). Les inflorescences apparaissent à la fin du printemps. De couleur blanche, elles développent un parfum sucré. Le fruit est une drupe ovale entourée d'une pulpe charnue de couleur jaune pâle, à haute teneur en huile.

Le Neem pousse de préférence dans les régions tropicales et subtropicales. Cependant, c'est un arbre peu exigeant qui s'adapte facilement aux conditions pédoclimatiques de son environnement. Il supporte des températures allant de 4°C à 44°C et une pluviométrie variant entre 400 mm et 1500 mm. Il peut pousser jusqu'à une altitude de 1500 mètres.

Sa distribution géographique est donc très étendue puisqu'il est présent en Inde, son milieu d'origine, en Indonésie, en Australie, en Afrique, dans le bassin Méditerranéen, en Amérique Latine et au sud des Etats-Unis.

III.3. Historique du Neem

Les produits issus du Neem appartiennent au quotidien de quasiment tous les indiens depuis des millénaires. Les feuilles sont utilisées dans la conservation des grains et des légumineuses pour lutter contre les attaques d'insectes en post-récolte (Neem the Ultimate Herb). Les feuilles sont aussi utilisées comme fourrages pour les animaux (Koul *et al.*, 1990) et les graines comme épices amères dans certains plats indiens. L'huile de Neem quant à elle, est utilisée autant que l'huile de castors en Amérique (Sinniah et Baskaran, 1981).

III.4. Toxicité

De nombreuses études ont été menées dans plusieurs pays et aux Etats-Unis en particulier sur la possible toxicité du Neem. Ces études ont montré que les feuilles et l'écorce de Neem ont une très faible toxicité, (Saraf et Joglekan, 1993; Chattopadhyay *et al.*, 1992; Khattak *et al.*, 1985; Sinniah et Baskaran, 1981). Biswas *et al.* (2002) a montré dans des tests de toxicité aigus sur les souris que l'extrait méthanolique d'écorce de Neem présente une LD₅₀ pour une injection orale de 13 g.kg⁻¹. De plus, Panda et Kar (2000) ont également étudié l'effet d'extrait de feuilles de Neem sur les fonctions thyroïdiennes des souris mâles. Ils ont étudié l'effet de deux doses différentes d'extraits de feuilles de Neem (40 et 100 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 20 jours. Il en ressort que la dose la plus élevée produit une diminution du taux sérique de triiodothyronine (T₃) et une augmentation de la concentration en thyroxine (T₄) alors que l'on n'observe pas d'altérations significatives à la dose de 40 mg/kg.jour. Cela veut dire qu'une dose trop élevée d'extrait de feuilles de Neem conduit à une inhibition des fonctions thyroïdiennes et particulièrement dans la conversion du T₄ en T₃, qui est la majeure source de T₃. Les extraits d'huile de Neem sont inoffensifs à des doses faibles (Khare *et al.*, 1984 ; Talwar *et al.*, 1995 ; Sinha *et al.*, 1984). Des tests sur animaux de l'U.S. « Environmental Protection Agency », ont montré que les extraits alcooliques des graines de Neem n'ont pas d'effets nocifs sur les lapins et les souris quand ils sont administrés par voie orale et ce, même à des doses élevées (Larson, 1987). Ingérée, l'huile de Neem peut engendrer des nausées et un malaise généralisé (Puri, 1993), qui seraient dus à sa grande richesse en composés soufrés. Une consommation excessive d'huile de Neem brute peut aussi créer une diminution des fonctions vitales et des perturbations du système nerveux central (Prakash *et al.*, 1991). Il est également déconseillé aux femmes enceintes d'ingérer de l'huile de Neem, car elle possède des propriétés contraceptives et pourrait causer des interruptions involontaire de grossesse.

III.5. Propriétés antimicrobienne et thérapeutique

Le Neem est connu depuis des millénaires en Inde pour ses nombreuses vertus. Dans le langage de l'Ayurveda, la médecine traditionnelle indienne, il est même surnommé « l'arbre-pharmacie » du fait de ses propriétés curatives et préventives (Biswas *et al.*, 2002) qui le font prescrire pour un nombre incalculable de maux et de maladies. Quelques exemples sont présentés ci-dessous :

- Prévention et guérison du paludisme : en Afrique et en Inde ; le Neem sert de répulsif naturel contre les moustiques, permettant une prévention naturelle contre le paludisme. De plus, il augmente le nombre de globules rouges et améliore l'oxygénation du sang, deux phénomènes qui évitent de contracter facilement la maladie. Enfin, les feuilles de Neem contiennent deux composés actifs, la gédunine et la quercétine qui sont aussi efficaces que la quinine ou la chloroquine, composés habituellement utilisés pour lutter contre la paludisme (Khalid *et al.*, 1986).
- Santé buccale : les brindilles de Neem sont mâchées et remplacent efficacement un dentifrice. Le Neem entretient une bonne santé générale des dents et des gencives et guérit les gingivites. Cette utilisation du Neem est peut-être une des plus répandues.
- Activité antifongique : les extraits de Neem sont extrêmement puissants contre les dermatoses et les maladies fongiques des végétaux. Il s'agit d'une plante renfermant un grand nombre de molécules actives de la famille des triterpénoïdes possédant des propriétés antimicrobiennes. Le tableau VII présente quelques composés répertoriés dans les différentes parties de la plante, avec leurs propriétés biologiques (Biswas *et al.*, 2002) :

Tableau VII : Liste de composés bioactifs présents dans le Neem selon Biswas *et al.*, (2002).

Composés	localisation	Activité biologique
Nimbine		Anti-inflammatoire Antiarthrite Antipyrétique Hypoglycémique Anti ulcère gastrique Spermicide Antifongique Antibactérien Diurétique
Nimbidate de sodium		Anti-inflammatoire
Nimbin	Huile de graines	Spermicide
Nimbolide	Huile de graines	Antibactérien Antimalaria
Gédunine	Huile de graines	Antifongique Antimalaria
Azadirachtine	Graines	Antimalaria
Mahmoodine	Huile de graines	Antibactérien
Acide gallique, épicatechin et catéchine	(-) Ecorce	Anti-inflammatoire et immunomodérateur
Margolone, margolonone et isomargolonone	Ecorce	Antibactérien
Trisulfide cyclique et tétrasulfide cyclique	Feuilles	Antifongique
Polysaccharides		Anti-inflammatoire
Polysaccharides GIa, GIb	Ecorce	Antitumoral
Polysaccharides GIIa, GIIb	Ecorce	Anti-inflammatoire
NB-II peptidoglycane	Ecorce	Immunomodérateur

Dans les pays occidentaux, le Neem est devenu un produit essentiel de l'aromathérapie.

La santé humaine n'est pas le seul secteur qui utilise le Neem car, les utilisations agricoles de cette plante sont nombreuses. Ainsi, les graines et les feuilles sont connues pour avoir une activité antimicrobienne et sont utilisées en agriculture pour la protection des cultures et la conservation post récolte. On peut ainsi citer l'utilisation de feuilles de Neem séchées en couches qui permet de protéger les grains récoltés contre les parasites. Pour protéger le sorgho ou le maïs du Foreur de tige (*Busseola fusca*), de la poudre de graines est épandue dans les champs.

Le Neem (l'huile ou les feuilles), on l'a vu, a des propriétés répulsives à l'encontre de certains parasites mais aussi a des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries, les levures et les champignons. C'est son effet antifongique qui fait l'objet de notre étude.

Pour son utilisation, les organes de l'arbre subissent des transformations qui varient selon les pays et les traditions. D'une manière générale, les feuilles et les racines sont utilisées en décoction et l'huile est extraite des graines.

III.6. Composition des différentes parties du Neem

III.6.1. Les Feuilles

Les feuilles de Neem ont une teneur en eau de 59%. Elles sont composées (en MF) de 6% de fibres, 22% de polysaccharides, 7% de protéines (dont des acides aminés essentiels), 1% de lipides, 3% de minéraux (Dakshinmurti, 1954) ; (Mitra and Misra, 1967). Il a aussi été rapporté que les feuilles de Neem contiennent des caroténoïdes et de l'acide ascorbique (Bhandari and Mukerjii, 1959). Le tableau VIII fait un récapitulatif de la composition physico-chimique des feuilles de Neem.

Tableau VIII : Composition physico-chimique des feuilles de Neem.

Composés	Teneur
Teneur en eau	59,4%
Protéine	7,1%
Lipides	1%
Fibres	6,2%
Glucides	22,9%
Minéraux	3,4%

Cependant, les composés bioactifs majoritaires se retrouvent plutôt dans les grains et l'huile. On les retrouve aussi dans les feuilles et l'écorce, mais dans des concentrations très faibles. De plus, la plupart des composés actifs amers sont solubles dans l'alcool et l'eau.

III.6.2. L'écorce

L'écorce de Neem est considérée comme ayant le même intérêt thérapeutique que les feuilles dans la tradition Ayurvédique. Elle est utilisée généralement pour les soins dentaires. Elle est connue pour être riche en catéchines. Elle contient, entre autre, environ 3% de protéines, 0,7% d'alcaloïdes et 4% de minéraux. Elle contient aussi des composés actifs comme la nimbine, la nimbinine, la nimbidine, la nimboesterol (Bhandari et Mukerjii, 1959; Vashi et Patel, 1988). On y trouve aussi de l'acide gallique, de la (+)-gallo catechine et de l'(-)-épicatechine, ce sont des polyphénols.

III.6.3. L'huile de Neem

Les grains de Neem sont très riches en huile, souvent plus de 50% du poids sec des graines. L'huile de Neem est très amère avec une odeur d'oignon et de soufre. Elle contient de la vitamine E et des acides aminés essentiels (Skellon *et al.*, 1962). Le tableau IX, nous donne la composition en acides gras de l'huile de Neem et le tableau X quelques caractéristiques physicochimiques de cette même huile. La composition varie d'un échantillon à un autre et varie aussi en fonction de la période de récolte des graines. Les composés actifs sont nombreux. L'âge des graines et les conditions de stockage peuvent déterminer la concentration des composés actifs (Lavie *et al.*, 1971).

Notre étude se focalise sur l'activité antimicrobienne de l'huile de Neem.

En ce qui concerne les molécules d'intérêt du Neem, on a longtemps pensé que l'azadirachtine, la molécule spécifique du Neem, était le seul ingrédient actif de cette espèce. Cependant, d'après Gauvin *et al.* (2003), il n'y a pas de relation entre la quantité d'azadirachtine et la puissance du pouvoir insecticide et antimicrobien de l'huile de Neem. De plus, Biwas *et al.* (2002) ont dressé la liste des molécules bioactives du Neem. Le tableau en présente certaines.

Tableau IX : Composition centésimale en acides gras de l'huile de Neem
(Srivastava et Prasad, 2000).

ACIDES GRAS	%
Acide Myristique C14 : 0	0,2-0,26
Acide Palmitique C16 : 0	13,6-16,2
Acide Stéarique C18 : 0	14,4-24,1
Acide Arachidique C20 : 0	0,8-3,4
Acide Lignocérique C24 : 0	-
Acide Oléique C18 : 1	49,1-61,9
Acide Linoléique C18 : 2	2,3-15,8

Tableau X : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de Neem.

Aspect	pâteux à 20°C
Odeur	épicée caractéristique
Couleur	vert marron
Densité	0,908 à 0,934 à 30°C
Indice de saponification	175 – 205
Indice d'iode	65 – 80
Indice de réfraction	1,4615 à 1,4705 à 40°C
Autres	thermolabile et photodégradable



(a)



(b)



(c)

Figure 10 : *Melia azedarach* : vue globale de l'arbre (a), fruits (b), feuilles (c)
(source : W.SAGOUA)

III.7. Plante de la même famille que le Neem : *Melia azedarach*

Melia azedarach ou « Chinaberry », est également un arbre de la famille des Méliacées. Il est, tout comme le Neem, est originaire d'Inde (Nardo *et al.* 1997). L'arbre est plus petit, atteignant au maximum 12 mètres de haut (figure 10a). Les feuilles sont claires, ovales et bipennée (figure 10c). Les fleurs sont violacées et ont une odeur forte, semblable à celle du Neem. Son fruit est une drupe ronde (figure 10b) dont le péricarpe est composé de deux parties : le sarcocarpe, dérivée de l'exocarpe et du méricarpe, est charnue et de couleur jaune foncé; la seconde ou sclérocarme, caractéristique des drupes, est lignifiée et forme le noyau, qui contient et protège les graines.

Melia azedarach est utilisé pour divers usages. Effet, il est utilisé dans la pharmacologie traditionnelle (Kataria, 1994), il est également connu pour avoir des propriétés insectifuges (Valladares *et al.*, 1997 ; Valladares *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 1995). Ces propriétés sont dues, d'après (Bohnenstengel *et al.*, 1999 ; Carpinella *et al.*, 2002) aux limonoïdes qu'il contient. Il est aussi rapporté que des composés comme le 28-déacétylsendanine extrait des fruits de *Melia azedarach* entraîne une inhibition de la réplication de virus (Kim *et al.*, 1999). Carpinella *et al.* (2003) ont également démontré que les extraits éthanolique et hexanoïque de différentes parties de la plante (fruits, graines, feuilles) avaient un effet fongistatique sur *Aspergillus flavus*, *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionales*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Sclerotinia sclerotiorum*, qui sont des phytopathogènes, pour des doses minimales d'inhibition de l'ordre de respectivement 0,5 à 25 mg.mL⁻¹ et de 0,5 à 5 mg.mL⁻¹ pour les extraits hexanoïque de feuilles et éthanolique de graines.

Tableau XI : Caractéristiques physico-chimiques de la lactoperoxydase Bovine selon Kussendrager et van Hooijdonk, (2000).

Caractéristiques	Données	Références
Poids moléculaire	78 431 Da	Paul et Ohlsson, 1985
Résidus acides aminés	612	Cals <i>et al.</i> 1991
Cystine	8	Cals <i>et al.</i> 1991
Glucides	10%	Carlstrom, 1969
Fer	0,07%	Paul et Ohlsson, 1985
Groupe Prosthétique	Hème : protoporphyrine IX	Thanabal et La Mar, 1989
Ph isoélectrique	9,6	Paul, 1963
Structure secondaire	23% α , 65% β , 12% non mesuré	Sievers, 1980
Coefficient d'extinction molaire $E_{412\text{ nm}}$	$112,3\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$	Paul et Ohlsson, 1985
Absorbance 280 nm	14,9-15,01%, 1 cm	Paul et Ohlsson, 1985
Potentiel Redox E_m	-191 Mv	Paul et Ohlsson, 1985

c. Structure chimique tertiaire de la lactoperoxydase

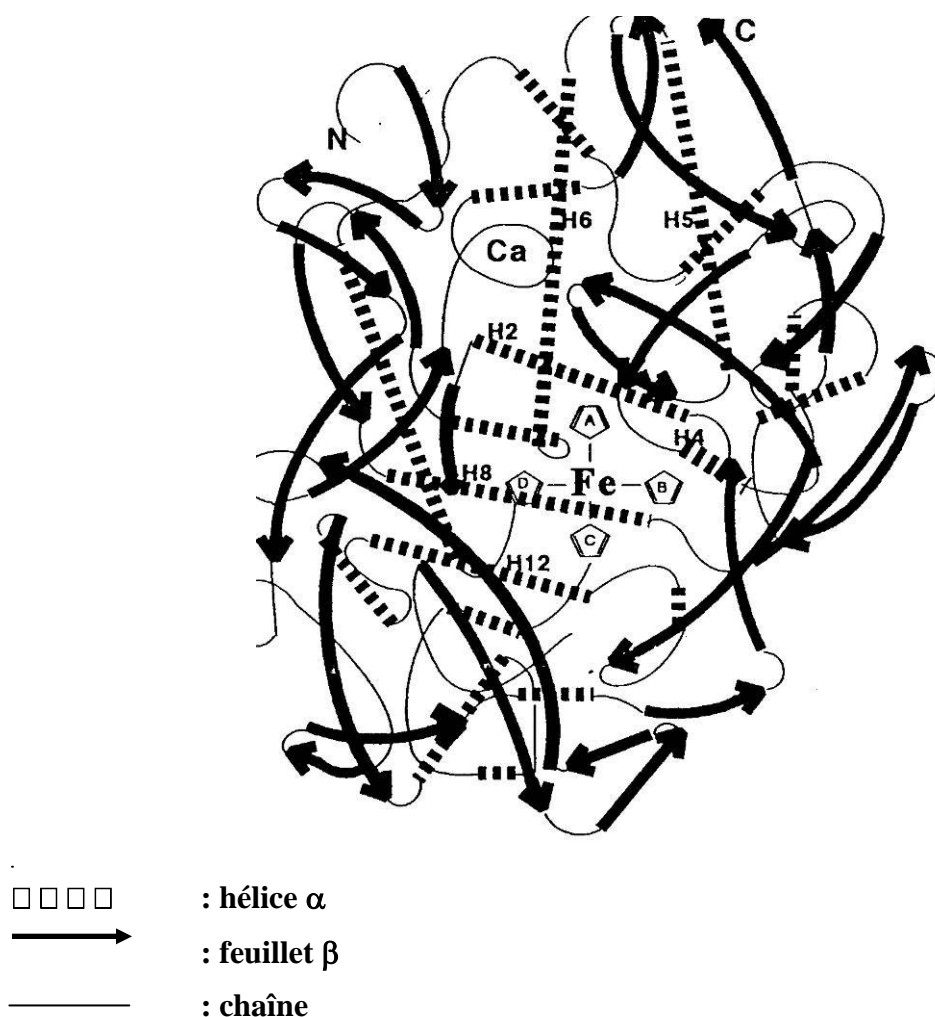


Figure 11 : Structure schématique tridimensionnelle de la molécule de lactoperoxydase bovine. Les hélices sont numérotées selon leurs positions dans la chaîne polypeptidique (Thanabal et La Mar, 1989).

IV. Le système lactoperoxydase

IV.1. Système lactoperoxydase (LPS)

Le système lactoperoxydase (LPS) est un système antimicrobien présent dans le lait. Il a été proposé de l'utiliser pour aider à la stabilisation du lait cru dans les zones où il est impossible d'utiliser la réfrigération pour des raisons technique et économique (Naidu, 2000 ; Loiseau *et al.*, 1998). Il s'agit d'un système antimicrobien qui se compose de trois éléments : l'enzyme lactoperoxydase, le thiocyanate (SCN^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

IV.1.1. La Lactoperoxydase

La lactoperoxydase (EC 1.11.1.7) (LP) (figure11) est une enzyme de la famille des peroxydases. Il s'agit d'un groupe d'enzymes largement répandues dans la nature. On les rencontre tant dans le règne végétal qu'animal et même chez l'homme. Leur première fonction est de catalyser l'oxydation de certaines molécules en présence de peroxyde d'hydrogène dans le but de générer des composés présentant une large activité antimicrobienne (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). C'est à la peroxydase isolée du lait qu'a été donné le nom de lactoperoxydase (Reiter et Härnult, 1984). Elle joue un rôle important dans la protection des glandes mammaires et dans le tractus intestinal des nouveau-nés où elle inhibe la croissance des micro-organismes pathogènes (Naidu, 2000).

La lactoperoxydase est aussi présente dans tous les laits étudiés jusqu'à présent (Pruitt et Kamau, 1991). Elle est présente également dans la salive et les glandes lacrymales des mammifères (Wolfson et Sumner, 1993). L'effet de la lactoperoxydase dans l'inhibition de la croissance microbienne a été suggéré pour la première fois par Hassen (1924). Elle est chimiquement et immunologiquement similaire dans les glandes mammaires, la salive et les glandes lacrymales (Tenovuo, 1985).

a. Mécanisme d'action

La lactoperoxydase catalyse la peroxydation de l'ion thiocyanate SCN^- et des ions iodure et bromure I^- , Br^- pour donner les ions OSCN^- , OI^- , OBr^- , qui ont, soit une activité bactéricide, soit bactériostatique vis-à-vis de plusieurs espèces microbiennes (Ihalin *et al.*, 2005).

L'analyse par résonance magnétique nucléaire a permis de montrer que les ions SCN^- et I^- se liaient à la même position sur l'enzyme. La liaison avec l'ion I^- étant la plus forte (Modi *et al.* 1989).

La stabilité de l'ion OSCN^- est affectée par la valeur du pH, la lumière, la présence d'ions métalliques (Fe, Ni, Cu, Mn, etc.), de glycérol et de sulfate d'ammonium (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000).

Le LPS qui utilise les ions SCN^- et I^- comme donneurs d'électrons est rapporté comme ayant un effet bactéricide, levuricide et fongicide (Thomas, 1985 ; Guthrie, 1992). Les résultats optimaux sont obtenus quand le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est généré enzymatiquement par le système glucose oxydase-glucose (Perraudin, 1991).

b. Propriétés physico-chimiques de la lactoperoxydase

Le tableau XI présente quelques caractéristiques physico-chimiques de la lactoperoxydase bovine. La lactoperoxydase bovine est une glycoprotéine à hème métallique dont pH isoélectrique est de 9,6 avec un poids moléculaire de 78 kDa (Björck, 1990, 1992 ; Ekstrand, 1989). La partie glycosidique représente 10% de la masse molaire de l'enzyme. (Board, 1995 ; Paul et Ohlsson, 1985) La longueur d'onde maximale d'absorption est de 412 nm (Bardsley, 1985).

La lactoperoxydase est l'une des enzymes les plus stables du lait (Griffiths, 1986 ; Shakell-ur-Rehman et Farkye, 2003). C'est la raison pour laquelle son inactivation est utilisée comme témoin de bonne pasteurisation. L'activité lactoperoxydase est partiellement inactivée par une pasteurisation à 74°C pendant 15 sec, en gardant une activité suffisante pour catalyser la réaction entre le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène (Wolfson et Sumner, 1993). Korhonen (1980) rapporte que la lactoperoxydase garde son activité durant une pasteurisation normale du lait (63°C pendant 30 min ou 72°C pendant 15 sec), mais qu'elle est totalement inactivée à 80°C pendant 2,5 sec (Marks, Grandison et Lewis, 2001).

La lactoperoxydase adhère aux surfaces, ce qui peut entraîner une diminution marquée de l'activité des solutions diluées de lactoperoxydase conservées dans des récipients en verre (Björck et Mullan, 1993 ; Paul et Ohlsson, 1985 ; Pruitt *et al.*, 1990).

IV.1.2. Le Thiocyanate

L'ion thiocyanate (SCN^-) est largement présent dans les tissus et sécrétions animales. Il est aussi présent dans les glandes mammaires, la salive, les glandes thyroïdes et dans les organes comme l'estomac, les reins et les liquides physiologiques comme la synovie, les liquides cérébraux, cervicaux de la moelle, de la lymphe et le plasma (Reiter et Härnult, 1984 ;

Kussendrager et van . Sa concentration dépend du régime alimentaire de l'animal (Reiter, 1985). Les végétaux de la famille des crucifères (choux, choux de Bruxelles, choux-fleurs, carottes) sont particulièrement riches en précurseurs d'ions thiocyanate comme les glucosinolates (Reiter et Perraudin, 1991).

Davidson (1997) rapporte que le lait frais contient de 1 à 10 mg de thiocyanate par litre, ce qui est suffisant pour activer le LPS.

L'apport exogène, d'ions thiocyanate se fait sous forme de thiocyanate de potassium ou de sodium.

IV.1.3. Le Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le troisième composant du système lactoperoxydase. Il n'est normalement pas détecté dans le lait frais (FAO, 1999 ; Pruitt et Kamau, 1991).

Plusieurs *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* produisent suffisamment de peroxyde d'hydrogène dans des conditions d'aérobiose pour activer le LPS (Wolfson et Sumner, 1993). Le peroxyde d'hydrogène peut être ajouté ou généré par des réactions chimiques avec le percarbonate de sodium ou le peroxyde de magnésium (Kussendrager et van Hooijdonk, 2000). L'utilisation de système enzymatique pour la production de peroxyde d'hydrogène est possible en utilisant les systèmes glucose oxydase/glucose ou xanthine oxydase/hypoxanthine qui confèrent au LPS un effet antimicrobien plus important que lorsque que l'on ajoute directement de l' H_2O_2 (Reiter et Perraudin, 1991). Dans le cas du système glucose oxydase/glucose, le glucose est oxydé par l'oxygène de l'air, en présence de glucose oxydase, en gluconolactone puis en acide gluconique avec production de peroxyde d'hydrogène (figure 12).

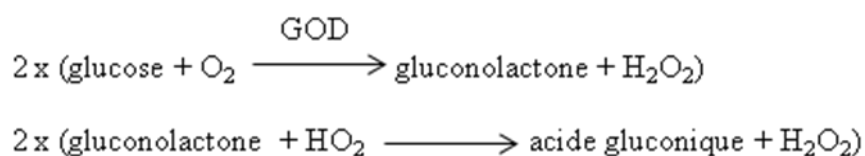


Figure 12 : Oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase

IV.2. Effets antimicrobiens du LPS

Les réactions catalysées par la lactoperoxydase sont principalement l'oxydation des ions thiocyanates en ions hypothyocyanate ($OSCN^-$) qui ont une activité antimicrobienne. Une mole d' H_2O_2 permet de produire une mole d'hypothyocyanate (Thomas, 1985).

La lactoperoxydase ayant une activité maximale à pH 5,5, il y a un équilibre entre la forme basique de l'ion hypothiocyanate OSCN^- et sa forme acide HOSCN . La forme HOSCN a un effet bactéricide plus marqué (Thomas et Aune, 1978).

Les trois étapes du fonctionnement du LPS sont décrites dans la figure 10 :

1. Production du peroxyde d'hydrogène : la réaction d'une oxydoréductase avec un substrat oxydable et la production concomitante du peroxyde d'hydrogène ;
2. Oxydation des ions thiocyanates en ions hypothiocyanate catalysée par la lactoperoxydase ;
3. Effet antimicrobien des ions hypothiocyanates.

L'ion hypothiocyanate oxyde les groupes sulfhydryliques, inactivant de ce fait plusieurs des protéines métaboliques essentielles comme des enzymes et des constituants des membranes des microorganismes.

Les microorganismes exposés au LPS libèrent immédiatement du potassium, des acides aminés et des polypeptides car leur membrane cytoplasmique subit des dommages structuraux.

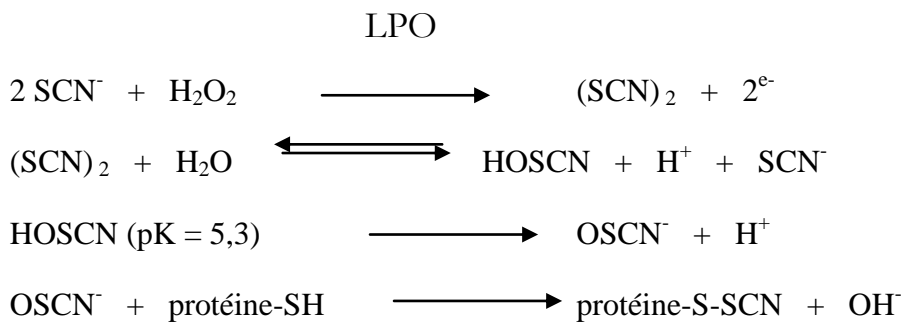


Figure 13 : Oxydation des groupes sulphydriles des protéines (enzymes) catalysée par la lactoperoxydase (Pruitt *et al.*, 1982).

Il existe deux types d'effet du système LPS sur les bactéries :

- ⇒ Effet bactéricide sur les bactéries Gram- catalase +
- ⇒ Effet bactériostatique sur les bactéries Gram + catalase + (Marshall et Reiter, 1980).

Le LPS inhibe un large spectre de levures et moisissures. En effet, Popper et Knorr (1997) ont rapporté l'activité antifongique du système LPS avec le système glucose oxydase/glucose comme source de peroxyde d'hydrogène en solution saline et dans du jus de pomme.

Rhodotorula rubra et *Saccharomyces cerevisiae* ont été cultivées en aérobiose dans du jus de pomme et *Mucor rouxii*, *Aspergillus niger* et *Byssoschlamys fluvas* dans de l'agar nutritif.

L'activité antifongique du LPS a été testée avec une suspension microbienne de 10^5 CFU.mL⁻¹ des microorganismes cités, diluée dans une solution saline dans laquelle on a rajouté du thiocyanate de sodium (25 mg.L⁻¹) et du glucose (20g.L⁻¹) ou du jus de pomme dans lequel on a rajouté la même quantité de SCN⁻ que précédemment. Une activité antifongique a été observée contre tous les microorganismes mentionnés précédemment et dans les deux milieux de culture. Jacob *et al.* (2000) rapportent que le LPS du lait de chèvre a la propriété d'inhiber la croissance et la prolifération de plusieurs champignons comme *Aspergillus flavus*, *Trichoderma spp.*, *Corynespora cassicola*, *Phytophthora meadii* et *Corticium salmonicolor* alors que la croissance de *Candida albicans* et de *Phytium spp.* n'est pas affectée par le LPS. On observe également parfois un effet réversible qui se traduit par une inhibition temporaire donc un effet fongistatique.

Applications du LPS

Tableau XII : Quelques applications du LPS et leur fonctionnalité
(de Wit et van Hooydonk, 1996).

Produits	Ajout de LPS	Fonction	Résultats observés
Lait cru	Endogène	Conservation	4 jours/4°C
Lait cru	SCN/H ₂ O ₂	Conservation	3 jours/10°C
Lait pasteurisé	SCN/H ₂ O ₂	Conservation	21 jours/10°C
Fromage	SCN/H ₂ O ₂	Conservation	8 jours/4-7°C
Yaourt	LP	Suppression d'acidité	14 jours/20°C
Emulsions	LP/KI/GO	Conservation	14 jours/20°C
Cosmétiques	LP/KI/SCN/GO	Conservation	2-4 mois
Dentifrice	LP/SCN/LYS/GO	Traitement	Journalier
Ophthalmologie	LP/KI/SCN/GO	Protection	1 semaine
Antitumoral	LP/GO/antibiotique	Traitement	Périodique

Légende : LP, Lactoperoxydase ; LPS, Système Lactoperoxydase ; GO, glucose oxydase ; LYS, Lysozyme

Bien que l'application industrielle la plus largement recommandée du système lactoperoxydase dans l'industrie agroalimentaire soit l'utilisation pour la conservation du lait cru pendant le stockage et/ou le transport vers les unités de transformation, de nouvelles applications sont actuellement explorées. En effet, en plus du gain en énergie, le système LPS est un procédé qui se fait à basse température et qui peut permettre de mieux préserver les nutriments et/ou la qualité de rétention pour les aliments très sensibles à la température comme les salades, les boissons et les desserts (Pruitt et Kamau, 1991). Ainsi, actuellement, le système lactoperoxydase est utilisé dans l'industrie cosmétique et dans l'industrie

agroalimentaire pour la conservation des produits de 4^{ème} gamme, dans tout ce qui concerne les soins de la bouche (dentifrice, bain de bouche). Le tableau XII, nous indique quelques applications actuelles du LPS dans l'industrie agroalimentaire.

En agriculture, l'entreprise Koppert a élaboré (et déposé un brevet) un fongicide naturel sur la base du système lactoperoxydase (Enzicur) pour le traitement des cultures de fraisier, aubergine, concombre, poivron et tomate contre l'oïdium.

V. LA LACTOFERRINE

V.1. Lactoferrine

La Lactoferrine (LF) est une glycoprotéine présente dans la plupart des sécrétions externes. La Lactoferrine humaine et la Lactoferrine bovine diffèrent. La LF bovine se différencie par son affinité pour le fer qui est de 35 fois plus élevée que celle humaine, et une liaison avec le fer stable à des valeurs de pH comprises entre 3,0 et 7,0. Elle a un pH isoélectrique compris entre 8,4–9,0. La LF est sécrétée par les glandes mammaires. Sa concentration dans le lait varie selon l'espèce ; dans le lait humain, elle est élevée (1 à 2 mg.mL⁻¹) (Hennart, 1991). La concentration en lactoferrine bovine varie également au cours du cycle de lactation.

V.1.1. Structure de la lactoferrine

La Lactoferrine bovine est une protéine globulaire dont la structure primaire est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 689 résidus d'acides aminés, incluant 17 ponts disulfures intramoléculaires avec aucun groupement sulfhydriles (Cys) libre (Pierce *et al.*, 1991). Son poids moléculaire théorique est de 76 110 Da (Farrell *et al.*, 2004).

L'analyse cristallographique de la lactoferrine par spectroscopie de diffraction des rayons X a permis de déterminer les structures secondaires et la structure tertiaire de la protéine (Moore *et al.*, 1997). Les structures secondaires de la LF comprennent approximativement 41% d'hélices α et 24% de feuillets β . Sa conformation comprend deux lobes, les lobes N (résidus 1-333) et C (résidus 345-689) qui correspondent respectivement aux extrémités N-terminale (N-t) et C-terminale (C-t) de la protéine. Les deux lobes de la protéine sont connectés par une courte hélice α (résidus 334 à 344) (Moore *et al.*, 1997) (Figure 14).

La lactoferrine possède également cinq sites possibles de glycosylation.

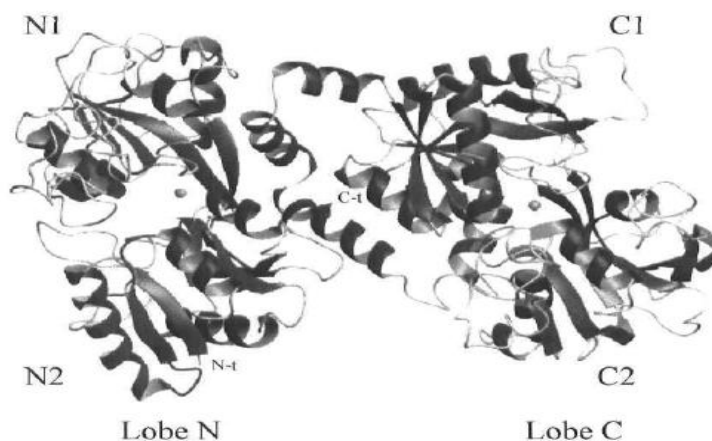


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la lactoferrine bovine (en présence d'ions Fe^{3+}). Adapté de Vogel *et al.* (2002). N1 et N2 : domaines du lobe de l'extrémité N terminale (N-t) ; C1 et C2 : domaines du lobe de l'extrémité terminale (C-t). Les deux Fe^{3+} sont représentés par les deux sphères

V.1.2. Caractéristiques physico-chimiques de la Lactoferrine

La lactoferrine a la capacité de fixer deux ions ferriques Fe^{3+} réversiblement en synergie avec un anion bicarbonate (CO_3^{2-}). La fixation du fer par la Lactoferrine lui confère une couleur rose-saumon en solution. L'intensité de la coloration augmente avec le niveau de saturation en fer de la protéine. L'absorbance du complexe LF/Fe^{3+} , qui est maximale à 465 nm, permet de déterminer le niveau de saturation en fer de la protéine (Groves, 1960). La nomenclature apo-LF et holo-LF est utilisée pour désigner respectivement les lactoferrines non saturées et saturées en fer. L'affinité de la LF pour le fer est très grande. La constante d'affinité de la LF pour les ions ferriques Fe^{3+} est de 10^{20} (Baker, 1994), alors qu'elle est nettement inférieure pour les ions ferreux (Fe^{2+}), soit 10^3 . Ainsi la LF fixe le fer de façon préférentielle sous la forme ferrique mais peut également lier d'autres ions métalliques *in vitro*. Des complexes stables ont été observés avec les ions Al^{3+} , Cr^{3+} , VO^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} (Baker, 1994).

L'hydrolyse partielle de la Lactoferrine en présence de la pepsine stomacale donne lieu à la formation de la lactoferricine. Ce peptide riche en acides aminés basiques chargés positivement aurait des propriétés bactéricides plus importantes, plus particulièrement en diminuant l'intégrabilité des membranes bactériennes qui deviennent poreuses (Tomita *et al.*, 2002).

Compte tenu de sa structure particulière, de sa charge basique et de sa capacité à lier le fer, la LF possède une multitude de propriétés à la fois nutritionnelles, fonctionnelles, antimicrobiennes et biologiques.

V.1.3. Propriétés fonctionnelles

La principale propriété fonctionnelle de la lactoferrine est son pouvoir antioxydant. Le pouvoir antioxydant de la Lactoferrine est principalement lié à sa capacité à chélater des métaux lourds (Fe^{3+} , Cu^{2+}) qui catalysent les réactions d'oxydation des acides gras insaturés responsables de la rancidité oxydative des aliments. L'effet antioxydant de la lactoferrine a été étudié dans différents systèmes modèles comme des extraits secs de matière grasse de soja, des émulsions à base d'huiles riches en acides gras insaturés et des liposomes (Huang *et al.*, 1999; Médina *et al.*, 2002; Steijns et van Hooijdonk, 2000). La capacité antioxydante de la lactoferrine a également été évaluée dans une variété de matrices alimentaires telles que des boissons lactées, des mayonnaises et des formules lactées pour nourrissons (Nielsen *et al.*, 2004).

V.1.4. Activités biologiques

L'activité biologique de la lactoferrine dépend de la saturation en fer de la molécule.

L'activité biologique de la LF ferro-insaturée est similaire à celle de la LF saturée, mais avec un degré d'efficacité moindre.

Les principales activités biologiques de la lactoferrine sont :

- activité antibactérienne,
- activité antivirale
- activité antifongique
- activation de la réponse immunitaire
- activité anticancéreuse,
- activité anti-inflammatoire
- activité anti-oxydante

V.1.4.1. Activité antibactérienne

La LF n'a pas d'effet bactéricide sur les germes qui ont un très faible besoin en fer. Par exemple, *E. coli* présente un besoin en fer important, alors que *Streptococcus lactis* n'en demande que très peu. Il n'est donc pas étonnant de constater que *E. coli* est inhibé par la LF, alors que *S. lactis* ne l'est pas.

Toutefois, il faut ajouter que si l'activité antibactérienne de la LF a été prouvée maintes fois *in vitro*, elle n'a pas encore été démontrée de façon irréfutable *in vivo*. De plus, certains spécialistes estiment que l'explication de l'inhibition de la croissance des bactéries par la seule fixation du fer n'est pas satisfaisante. L'activité bactériostatique de la LF a été

démontrée dans le mucus humain, dans le colostrum bovin et dans les sécrétions du pis hors lactation (Linden, 1994).

Les travaux d'Elass-Rochard *et al.* (1995) ont montré que la LF humaine et bovine possèdent deux sites de capture du lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli*. L'affinité de la LF pour la LPS contribue à l'inhibition des endotoxines de la bactérie.

La LF dans les larmes joue un rôle synergique avec les antibiotiques (vancomycine) inhibant la croissance de *Staphylococcus epidermidis*, principal agent pathogène des infections ophtalmiques. En effet, la présence de la LF double l'activité inhibitrice de l'antibiotique (Leitch et Willcox, 1999).

Le travail d'Ellison (1994) a prouvé que la protéine LF agit de façon synergique avec les immunoglobines, le complément, et les protéines cationiques des neutrophiles contre les bactéries gram-négatifs. Dans la protéine, c'est le peptide N-terminal de la LF qui fragmente la membrane externe des bactéries Gram-négatif.

Le pouvoir antibactérien des leucocytes du lapin, notamment la capacité à phagocyter les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* est due au fait que les cellules contiennent une grande quantité de LF (Bullen et Armstrong, 1979).

Zagulki *et al.* (1989) ont étudié l'interaction entre *E. coli* et la LF bovine et humaine. Des expériences ont été entreprises pour démontrer et expliquer partiellement l'effet protecteur de la LF bovine une fois administrée en intraveineuse aux souris 24 h avant une injection d'une dose mortelle d'*Escherichia coli*. Environ 70% des souris traitées préalablement avec la LF a survécu à l'injection. Les taux de survie chez des souris non traitées et traitées préalablement avec de l'albumine sérique bovine (BSA), étaient de 4 et 8%, respectivement. La LF humaine a eu presque le même effet protecteur que la LF bovine.

Les propriétés antimicrobiennes de la LF ont été mises en évidence dans des composés associant la pénicilline G et la LF bovine. En effet ce composé augmente de 2 à 4 fois l'activité inhibitrice de la pénicilline sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. L'activité inhibitrice de la LF employée seule est de 16 à 64 fois plus importante que celle de la pénicilline (Diarra *et al.*, 2002).

V.1.4.2. Activité antivirale

La LF est capable de lier quelques antigènes de nature virale. Le mécanisme général de l'activité antivirale de la LF dépend de la fixation de celle-ci avec les glucosamineglycanes des membranes des eucaryotes. Le complexe LF-glucosamineglycanes joue en rôle protecteur en bloquant la pénétration des virus. Ce mécanisme est observé en cas d'infection avec le

cytomégalovirus responsable de l'herpès et le virus de l'immunodéficience humaine (SIDA) (Linden., 1994).

Les mécanismes de l'activité anti-hantavirale de la LF bovine ont été étudiés par Murphy *et al.* (2001). La LF combinée à un traitement pré- et post-infection de ribavirine a complètement empêché la formation de lésions virales. Ceci suggère que la LF empêche l'adsorption virale par les cellules. D'autres études attestent de l'efficacité de la LF dans des utilisations cliniques en tant qu'agent curatif protecteur des hantavirus. La LF associée à la ribavirine est la thérapie de combinaison employée comme mesure contre l'infection à hantavirus chez l'homme.

Niehaus *et al.* (2000) ont utilisé la teneur en LF des sécrétions nasales pour différencier le rhume de cerveau de la sinusite plus sérieuse. La LF se retrouve dans toutes sécrétions où les membranes baignent. Dans le mucus, elle est une première ligne de défense contre les virus et autres agents pathogènes. Ainsi les plus hautes teneurs de LF sont normalement retrouvées dans les sécrétions nasales de patients atteints de sinusites sérieuses. Il est possible de distinguer la sinusite des rhumes de cerveau en comparant les concentrations en LF des sécrétions nasales.

V.1.4.3. Activité antifongique

Andersson *et al.* (2000) montre que la LF est la protéine du lait qui empêche la croissance de champignons dangereux. Le lait humain est reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes et il a été montré à maintes reprises que les bébés nourris au sein résistent mieux aux infections que les bébés allaités artificiellement. Alors que la plupart des études ont convergé sur les activités antibactériennes et antivirales du lait maternel, peu se sont intéressées à son effet antifongique. Les infections dermiques causées par les mycètes sont communes chez les bébés atteints de retard de croissance.

V.1.4.4. Activation de la réponse immunitaire

Dhennin-Duthille *et al.* (2000) ont montré que la LF était impliquée dans la régulation de lymphocytes CD4, essentiels pour les capacités de lutte de l'organisme malade.

V.1.4.5. Activité anti-inflammatoire

La LF module le processus inflammatoire, principalement en stimulant précocement l'excrétion des cytokines des monocytes, et en régulant la prolifération et la différenciation des cellules immunisées. Certaines de ces activités sont liées à l'affinité de la LF pour certains

lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface des monocytes. Prise dans l'ensemble, ces observations suggèrent fortement que la LF est l'une des molécules principales qui modulent la réponse inflammatoire (Baveye *et al.*, 1999).

V.1.4.6. Activité anti-oxydante

Les propriétés anti-oxydantes de la LF dépendent de sa capacité à fixer les ions ferriques (Kanyshkova *et al.*, 2001).

V.1.4.7. Activité anticancéreuse

La LF est capable de participer aux processus de prolifération et de différenciation cellulaires. Elle a également été identifiée en tant que « Colony Inhibitory », agissant au niveau des cellules de la moelle épinière durant la myélopoïèse (Linden., 1994).

Les cellules traitées à la lactoferrine montrent un arrêt définitif de toutes les fonctions, y compris l'arrêt de l'activité métabolique des précurseurs de l'ADN et de l'ARN.

Matériel et Méthodes

I. Matériels végétal et biologique

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Les graines de Neem

Les graines de Neem proviennent de 3 origines géographiques différentes :

- Sénégal : ont été fournies par l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherche Agronomiques) situé à Thiès.
 - Cameroun : elles proviennent de Garoua dans le nord du pays.
 - Inde (Pitampura, Delhi) : Elles ont été envoyées par la société Shree Keshaw Agro (p) Ltd.
- Toutes ces graines nous sont parvenues déjà séchées, nous les avons néanmoins séchées à l'étuve à 55°C jusqu'à obtention d'un poids constant.
- Huile végétale vierge de Neem bio, origine Inde, 100 mL, obtenue chez Hyteck Aromazone, Clermont-Ferrand, France

I.1.2. Les bananes

Les bananes utilisées sont des bananes dessert du sous groupe Cavendish (*Musa sp.*) d'origine République Dominicaine, stockées à 13°C pendant 2 jours avant inoculation.

I.2. Matériel biologique

Les espèces fongiques pathogènes utilisées sont contenues dans le tableau XIII. Ces champignons ont été isolés et identifiés au laboratoire de phytopathologie du CIRAD-Baillarguet (Montpellier).

Tableau XIII : Espèces fongiques utilisées au cours de l'étude.

Code	Genre	Espèces	Hôte	Variété	Organe	Origine	Région
Co GLP 9	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banane	grande naine	Pièces florales	Guadeloupe	Dingue
GI 310 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banane	nd	Pièces florales	Guadeloupe	nd
Co GLP 18	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banane	grande naine	Pièces florales	Guadeloupe	Dingue
GI 12.3 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banane	nd	Pièces florales	Guadeloupe	nd
GI 5.1 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banane	nundu	Fruit	Guadeloupe	nd
Co CMR 64	<i>Colletotrichum</i>	<i>Sp</i>	Banane	nd	nd	Cameroun	Njombe
Co CMR 55	<i>Colletotrichum</i>	<i>Sp</i>	Banane	hybrid	Fruit	Cameroun	Njombe
ac 60 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>Acutatum</i>	Banane	grande naine	Pièces florales	Guadeloupe	Dingue
mu 12.2 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>Musae</i>	Banane	nd	Pièces florales	Guadeloupe	nd
mu 6.12 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>Musae</i>	Banane	nd	Pièces florales	Guadeloupe	nd
C 46.12	<i>Colletotrichum</i>	<i>Musae</i>	Banane	nd	nd	Guadeloupe	nd
Co CMR 52	<i>Colletotrichum</i>	<i>Musae</i>	Banane	nd	Fruit	Cameroun	Njombe
Co CMR 62	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banane	P. Abu Perak	Fruit	Cameroun	Njombe
B 017	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	Noix de coco	nd	nd	Nc	nd
B 027	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	Mangue	nd	nd	Nc	nd
B 006	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	Cacao	nd	nd	Nc	nd
Fusarium	<i>Fusarium</i>	<i>sp</i>	Nd	nd	nd	Nc	nd

nd, non déterminé

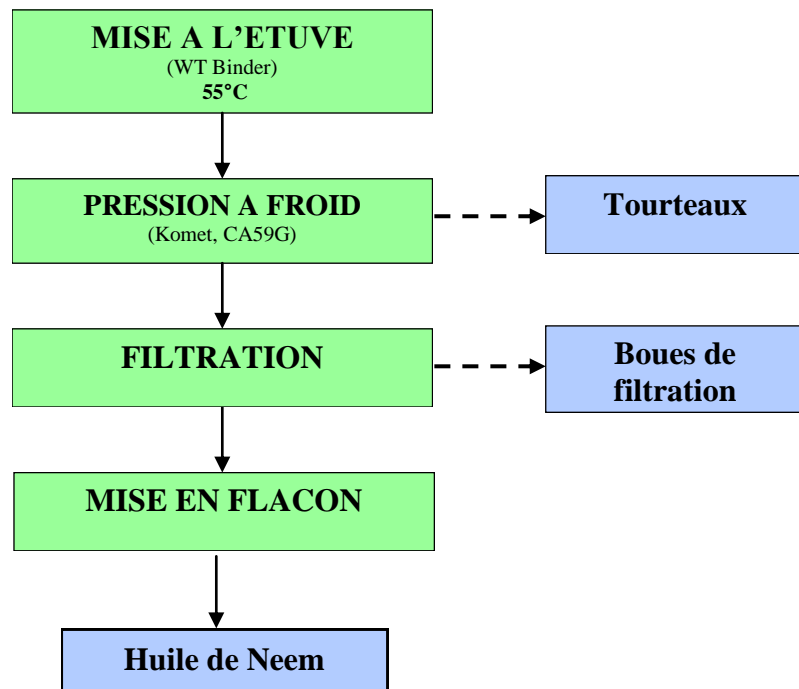


Figure 15 : Schéma du procédé d'obtention d'huile par pression à froid.

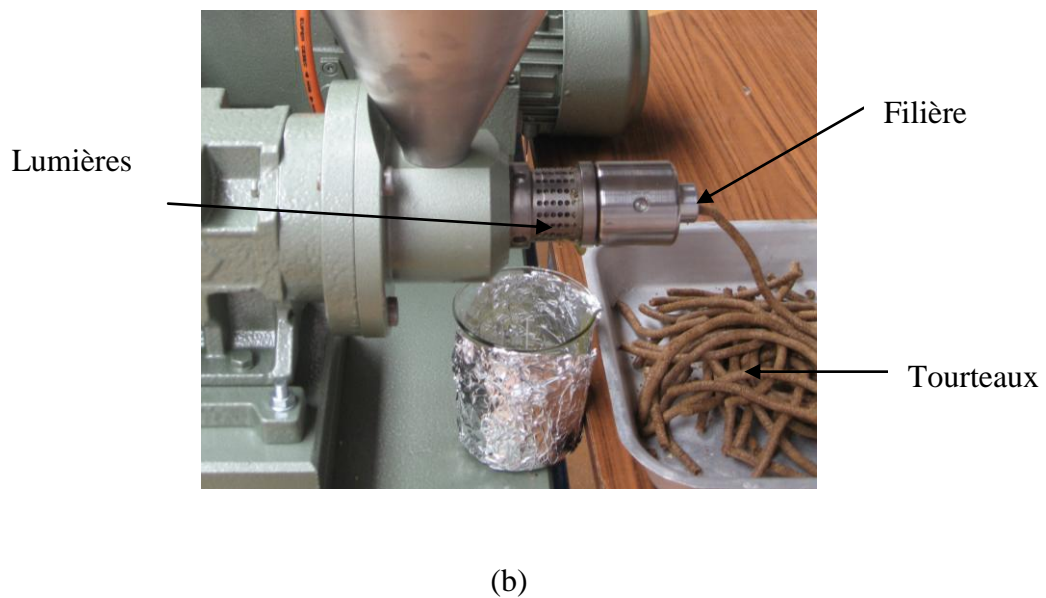
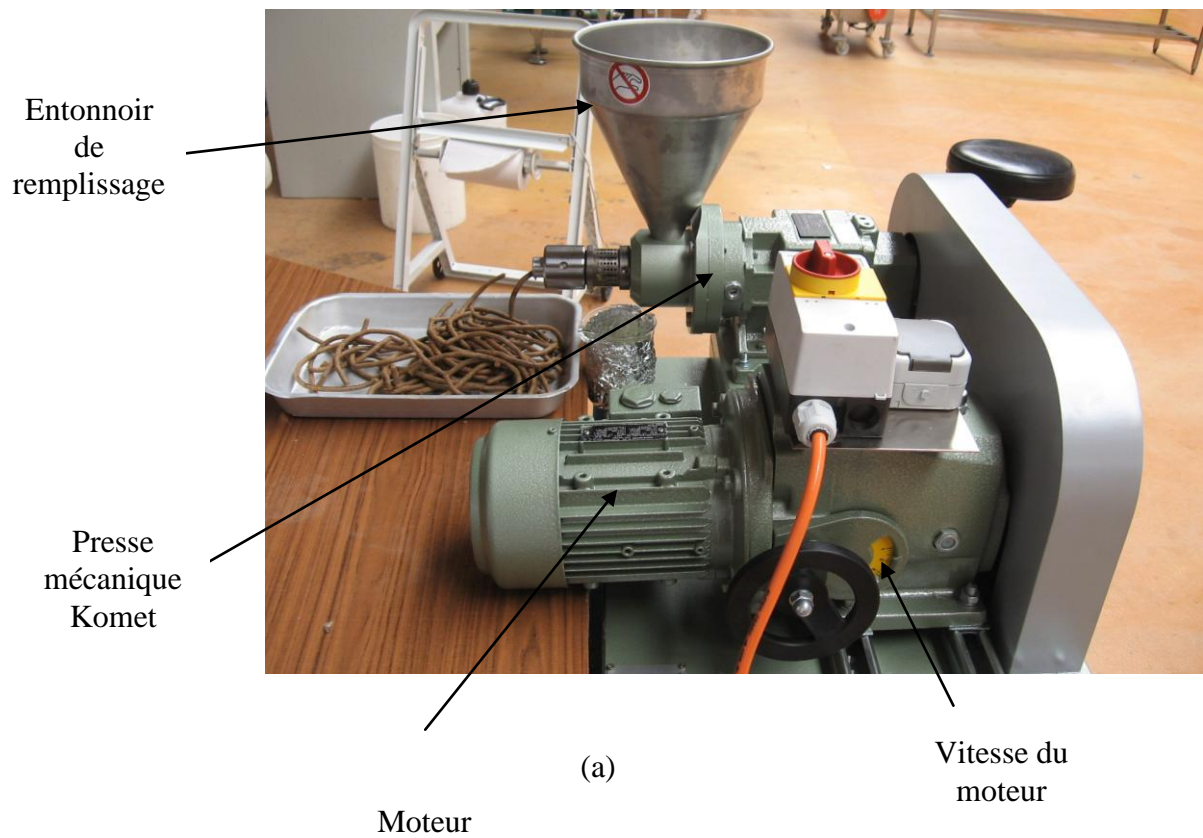


Figure 16 : Montage de la presse mécanique : général (a) et détail de l'extraction (b).

II. Etude technologiques

II.1. Extraction des Huiles de Neem

II.1.1. Extraction par pression mécanique à froid

L'objectif de cette manipulation est d'obtenir une huile végétale extraite selon un procédé mécanique, exempt de tout contact avec des produits chimiques.

L'extraction de l'huile de Neem par pression mécanique à froid a suivi les étapes schématisées sur la figure 15.

Les graines nous sont parvenues déjà sèches. Dans un premier temps, elles ont été triées (pour enlever les pierres et tout autres éléments indésirables), elles ont été ensuite lavées à l'eau de javel diluée (hypochlorite 80 ppm) et séchées à l'étuve à 55°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

L'extraction a été effectuée à l'aide d'une presse mécanique Komet CA59G, Allemagne (figure 16). La presse est une vis sans fin sur laquelle est fixé un cylindre métallique percé de « lumières », par lesquelles sortent l'huile, et se termine par une filière par laquelle sortent les tourteaux. C'est la pression exercée par la vis sur la filière qui provoque l'extraction de l'huile. Les filières sont numérotées de 2 à 10, 2 étant la filière la plus étroite. Le choix de la filière dépend de la taille des graines utilisées. La filière 6 a été utilisée pour les graines du Sénégal et du Cameroun et la filière 4 pour les graines d'Inde.

A la fin de l'extraction, on obtient une huile de Neem brute (mélange d'huile et de boue), qui sera filtrée à l'aide de filtre à café (« Filtration douce », 1 x 4, Mellita®, France).

L'huile filtrée est ensuite embouteillée dans des bouteilles en aluminium adaptées aux conditionnements des huiles. Les tourteaux obtenus après le pressage des graines et les boues de filtration seront gardés pour extraction par Soxhlet.

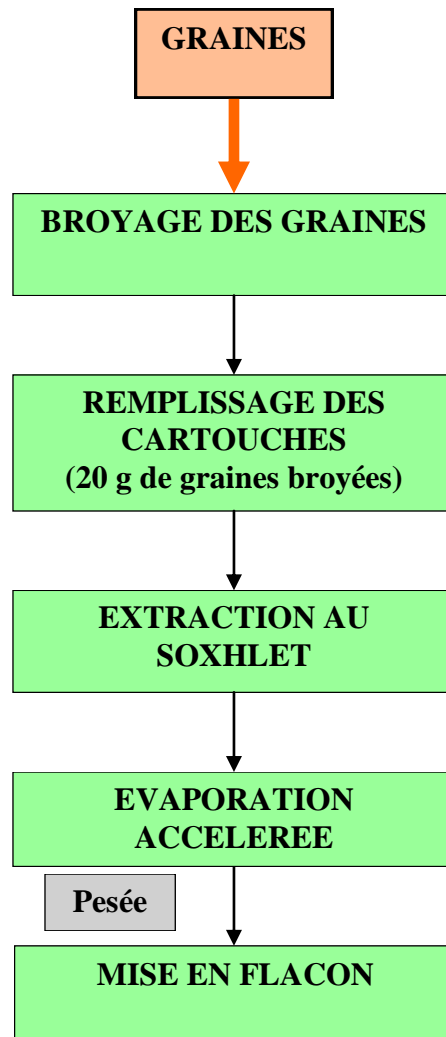


Figure 17 : Schéma du procédé d'extraction de l'huile au Soxhlet.

II.1.2. Extraction par Soxhlet

La figure 17 décrit la méthode d'extraction utilisée pour le Soxhlet. Les étapes sont similaires à celles retrouvées pour l'extraction mécanique, à quelques exceptions près :

- Les graines sont d'abord broyées à l'aide d'un mixeur TM 21 (Thermomix, Vorwerk, France), jusqu'à l'obtention d'une poudre.
- Vingt grammes de poudre sont introduits dans des cartouches, qui sont elles-mêmes placées dans un appareil à Soxhlet de 125 mL.
- Les ballons utilisés sont des ballons de 500 mL, placés dans des chauffe-ballons adaptés et reliés à un système de réfrigération.
- 250 mL d'hexane (99%) sont introduits dans les ballons.
- Le temps d'extraction total est de 8 h à 68°C.

A la fin de l'extraction, l'hexane est évaporé à l'évaporateur rotatif (Heidolph 94200, Bioblock Scientific) à une température de 40°C.

III. Étude de la composition des Huiles de Neem

Les produits chimiques proviennent tous de chez SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Allemagne).

III.1. Détermination de la composition en acides gras des huiles de Neem par Chromatographie Phase Gazeuse (CPG)

III.1.1. Principe :

Pour analyser les acides gras des huiles par CPG, il faut d'abord transformer ces corps gras en esters méthyliques. En plus d'une augmentation de la volatilité, le processus employé présente d'autres avantages comme : l'élimination de la polarité, l'amélioration de la stabilité chimique et thermique et le recul des limites de détection.

L'estérification se fait en deux étapes : la méthanolyse basique et l'estérification acide.

a. La méthanolyse basique

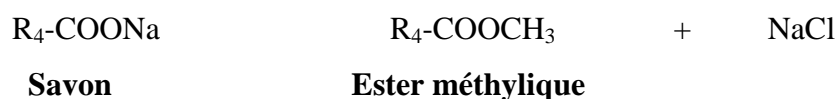
Equation de la méthanolyse basique par du méthylate de sodium :



Au cours de cette étape, les triglycérides sont transformés en esters méthyliques et les acides gras libres en savons. Il faudra donc réaliser une seconde étape pour transformer ces derniers en esters méthyliques.

b. L'estérification acide

Equation de l'estérification des savons en présence de méthanol chlorhydrique :



L'acidification du milieu par excès de méthanol chlorhydrique provoque une décomposition du savon en ester méthylique.

Suite à ces deux étapes, on rajoute à la préparation de l'hexane et de l'eau distillée. Après décantation, deux phases se forment : la phase hexanique, contenant les esters méthyliques et la phase aqueuse, avec le glycérol et le NaCl. Nous prélevons la phase hexanique pour l'analyse en CPG.

III.1.2. Préparation des réactifs

a. Solution de méthylate de sodium

La solution de méthylate de sodium est préparée en mélangeant 62 mL d'une solution de méthylate de sodium à 0,5 M dans du méthanol (560 mL de méthanol) et une goutte de phénolphtaléine pure.

b. Solution de méthanol chlorhydrique

Une solution de méthanol chlorhydrique est préparée en mélangeant avec précaution, 50 mL de chlorure d'acétyle à 625 mL de méthanol.

Mode opératoire : (Piombo et al., 2006)

- 10 mg d'huile à caractériser sont introduits dans un ballon contenant 2 à 3 pierres ponce.
- On rajoute 3 mL de la solution de méthylate de sodium.
- Une canne à saponification est placée au dessus du ballon et le mélange est chauffé à reflux pendant 10 min, à 65°C.
- On rajouter 3 mL de méthanol chlorhydrique jusqu'à décoloration de la phénolphtaléine puis on chauffe à nouveau le mélange à reflux pendant 10 min.
- Après refroidissement du mélange à température ambiante, on rajoute 8 mL d'hexane puis 10 mL d'eau distillée dans le ballon.
- On sèche sur sulfate anhydre de sodium, on filtre à l'aide d'un filtre organique de 0,45 µm puis on préleve pour l'analyse en CPG.

Conditions :

Les huiles de neem utilisées ont été extraites par pression mécanique à froid et proviennent du Sénégal, du Cameroun et d'Inde.

Trois répétitions par origine d'huile sont réalisées.

- les échantillons sont dilués au 1/5.
- L'injection se déroule en mode split, avec une fuite de 1/100.
- L'injecteur est chauffé à 250°C et le gaz vecteur est de l'hélium.
- La phase stationnaire est constituée de polyéthylène glycol.
- La température du four est de 185°C pendant 2 min puis augmente à raison de 4°C/min jusqu'à 225°C.
- Le détecteur FID est chauffé à 270°C.
- L'analyse dure 15 min.

III.2. Analyse des composés volatils de l'huile de Neem

III.2.1. Objectif

L'extraction moléculaire par SPME couplée à l'analyse par GC-MS a pour objectif d'identifier les molécules de la fraction volatile des huiles obtenues selon les différents modes d'extraction testés et/ou les différentes origines.

III.2.2. Principe

La SPME ou Micro Extraction en Phase Solide est une technique d'extraction de molécules qui, couplée à un dispositif GC-MS (Chromatographie en phase Gazeuse - Spectromètre de Masse), permet la qualification et la semi quantification des composés d'une substance.

L'extraction se réalise dans un flacon hermétiquement clos dont le bouchon possède un septum, une membrane souple que l'on peut transpercer. Le flacon contenant la matière à extraire est premièrement conditionné selon un protocole défini. L'aiguille de l'appareil SPME est amovible. Après avoir percé le septum, elle déploie dans l'enceinte du flacon une fibre en silice sur laquelle se trouve la phase solide, constituée d'un ensemble de polymères. Pendant le temps d'extraction, la fibre adsorbe les molécules de la substance. Une fois atteint le temps d'équilibration, la phase solide est saturée. La fibre se rétracte dans l'aiguille et se déplace automatiquement vers le point d'injection du chromatogramme, où elle se désorbe.

III.2.3. Mode opératoire

Toutes les huiles obtenues ont été analysées par SPME, par extraction en espace de tête.

0,5 mL de chaque huile ont été introduits dans des flacons de SPME. Le conditionnement des échantillons s'est effectué à 40°C pendant 30 min. Le temps de passage dans la colonne du

chromatogramme a été fixé à 48 min. Les composés volatiles sont identifiés grâce à la bibliothèque NIST.

III.2.4. Conditions

- L'injection se déroule en mode splitless.
- L'injecteur est chauffé à 250°C et le gaz vecteur est de l'hélium.
- La température du four est programmée par palier successif, en gradients, elle va passer de 40°C à 210°C, en 3°C.min⁻¹.

III.3. Analyse des composés triterpéniques de la fraction insaponifiable par HPLC-MS

III.3.1. Principe

L'huile est composée pour sa majeure partie de triglycérides. Ce sont des esters d'acides gras glycéridiques. En présence d'un alcalin à chaud, il y a hydrolyse de ces esters avec formation de savons et de glycérine, une partie correspondant à environ 2%, ne subit pas cette transformation ; ce sont les composés insaponifiables.

Préparation des échantillons d'analyse :

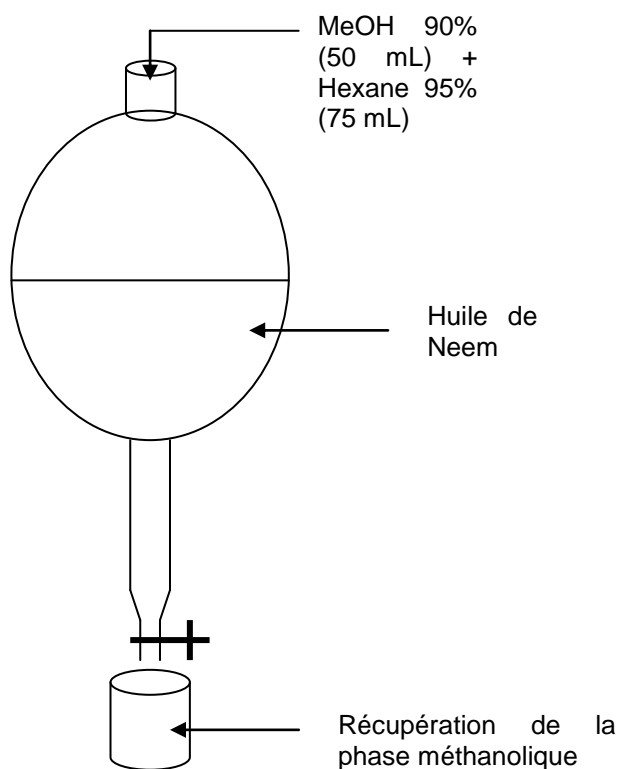


Figure 18 : Schéma d'extraction des triterpénoïdes de l'huile de Neem.

Cette méthode se base sur les travaux de Govindachari *et al.* 1998 (figure 18).

- Dans une ampoule à décanter, on introduit 50 mL d'huile de Neem.
- On ajoute 50 mL d'hexane et 75 mL de méthanol (MeOH) 90%.
- Après décantation, on récupère la fraction méthanolique (partie inférieure de l'ampoule).
- On évapore ensuite le MeOH 90% à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'une poudre jaunâtre.
- La poudre jaunâtre est dissoute dans 5 mL de MeOH pur.
- La solution est filtrée avec un filtre organique de porosité 0,45µm.
- On dilue au 1/100 dans du MeOH pur avant injection à l'HPLC.

III.3.2. Conditions

HPLC :

- L'élution est faite en mode isocratique avec mélange méthanol/eau, 50/50.
- Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Pression : 160 bars.
- Le volume injecté : 20µL.
- La colonne utilisée : C18 (dimensions 250× 4,6 mm porosité 5 µm).
- Le détecteur UV a été réglé à une longueur d'onde de 215 nm.
- Le temps d'analyse : 150 min.

MS :

- Les analyses ont été faites en mode APCI (APCI – et APCI +) et en mode ESI (ESI- et ESI +).

En APCI :

- Température de la source : 400°C.
- Le gaz nébuliseur est l'azote, à un débit de 60 mL.min⁻¹.
- Le courant appliqué est de 3,5 µA.
- Le tube capillaire est chauffé à 150°C, sous une tension de 25 V.

En ESI :

- Température de la source : 345°C.
- Le gaz nébuliseur est l'azote, à un débit de 55 mL.min⁻¹.

IV. Mise au point du Système Lactoperoxydase

IV.1. Optimisation du système : détermination des doses des différents constituants

Le kit de préparation du Système lactoperoxydase (tableau XIV) nous a été fourni par l'entreprise BIO SERAE (Bram, France).

Tableau XIV : Kit LPS fourni par BIOSERAE

Composant	Composition
Lactoperoxydase	>120 UI.mg ⁻¹
Glucose oxydase	>56 UI.mg ⁻¹
Thiocyanate de sodium	Pureté 90%

IV.1.1. Objectif

Dans un premier temps avec le LPS, il a fallu déterminer les concentrations des différents constituants du LPS pour obtenir un système actif optimum. Il a fallu en effet tenir compte du fait que nous avons modifié la source de peroxyde d'hydrogène, par rapport à nos travaux antérieurs (Le Nguyen, 2003 ; Julan, 2004). Nous avons donc eu à produire le peroxyde d'hydrogène par voie enzymatique grâce à la réaction entre le glucose et la glucose oxydase ce qui, d'après Reiter et Perraudin (1991), produit un effet antimicrobien plus important.

Nous avons testé 3 systèmes provenant des travaux de 3 auteurs différents. Ils sont contenus dans le tableau XV (Bosch *et al.*, 2000 ; Adolph *et al.*, 2006 et Boussouel *et al.*, 1999) :

Tableau XV : Composition des différents Systèmes Lactoperoxydase testés.

Système 1 (Bosch <i>et al.</i> , 2000)	
Lactoperoxydase	30 mg.L ⁻¹
Thiocyanate de sodium	1 mM (90 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	100 UI/L (1,79 mg.L ⁻¹)
Glucose	100 mM (18 g.L ⁻¹)
Système 2 (Adolph <i>et al.</i> , 2006)	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Thiocyanate de sodium	0,5 mM (45 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	8 mM (1,44 g.L ⁻¹)
Système 3 (Boussouel <i>et al.</i> 1999)	
Lactoperoxydase	35 mg.L ⁻¹
Thiocyanate de sodium	25 mg.L ⁻¹
Glucose oxydase	1 mg.L ⁻¹
Glucose	0,2 g.L ⁻¹

Le choix du système s'est fait en fonction de la concentration en ions OSCN⁻ produit pour chaque système.

IV.1.2. Préparation du réactif pour le dosage des ions OSCN⁻

- 40 mg de 3-carboxy-4-nitrophenyldisulfide ou DTNB
- 20 mg de Borohydrate de sodium (NaBH₄)
- 6,05 g de Tris [hydroxyméthyl] aminométhane
- 5 mL d'acide Chlorhydrique fumant à 37%
- 100 mL d'eau distillée

IV.1.3. Dosage des ions hypothyocyanate (OSCN⁻)

a. Principe

Il s'agit d'un dosage dérivé de celui utilisé pour doser les ions OSCN⁻ dans la salive. Les ions OSCN⁻ sont capables de réagir avec les groupements sulfhydriques d'une molécule de 3-carboxy-4-nitrophényldisulfide ou 5,5' Dithiobis (2-nitrobenzoic acide) (DTNB ou Nbs) préalablement réduite en présence d'un excès de borohydrate de sodium. Le réactif de l'état réduit (TNB) absorbe la lumière à une longueur d'onde de 412 nm et sa concentration peut être déterminée en appliquant un coefficient d'extinction molaire (S) de 13600 M⁻¹cm⁻¹.

La mesure est basée sur l'oxydation de 2 molécules de TNB par 1 molécule d'OSCN⁻ qui donne du DTNB, composé incolore. Lorsque les ions OSCN⁻ oxydent les groupements sulfhydriques, l'absorbance diminue proportionnellement à la quantité d'ions OSCN⁻ présents dans l'échantillon à doser.

Connaissant la quantité de TNB initiale, déterminée par mesure de l'absorbance à 412 nm de la solution de référence (en présence d'un échantillon témoin dépourvu de radicaux), on peut déterminer la concentration en ions d'un échantillon en mesurant la $\Delta A_{412 \text{ nm}}$ entraînée par la réaction du TNB avec les ions présents dans l'échantillon.

b. Mode opératoire

Plusieurs méthodes sont utilisées (tableau XVI). Après étude de chacune des méthodes, nous avons choisi d'utiliser celle présentée ci-dessous :

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, contenant 75 mL de tampon Tris-HCL à M pH = 7, 40 mg de DTNB sont introduit afin d'avoir une concentration finale de 1 mM.
- On rajouter (sous hotte) 20 mg de borohydrate de sodium, agent réducteur, à la solution de DNTB, la concentration finale est de 5 mM.

- On complète le volume à 100 mL avec du Tris-HCl. Le TNB étant photosensible, couvrir la fiole avec du papier aluminium.
- La quantité d'ions OSCN^- contenue dans un échantillon est dosée de la façon suivante :
 - ✓ On prépare deux cuves avec : 0,2 mL de TNB + 2,7 mL d'eau distillée.
 - ✓ Dans l'une des cuves (essai), 0,1 mL d'échantillon à doser (LPS) sont introduit et dans l'autre (standard) rajoute 0,1 mL d'eau distillée.

Calcul de la concentration en ions OSCN^- des échantillons.

$\Delta A_{412 \text{ nm}}$: lecture directe à 412 nm

La concentration en ions hypothiocyanate de calculera comme suit :

$$[\text{OSCN}^-] (\mu\text{M}) = \Delta A_{412} * 1102,9$$

Le coefficient 1102,9 comprenant le coefficient d'extinction molaire du TNB.

Tableau XVI : Comparaison entre les différentes méthodes de dosage des ions hypothiocyanate.

Méthode	Réactifs	Présence de tampon	Longueur d'onde de lecture	Formule
Julan, 2004	Borohydrate de sodium (20 mg), DTNB (40 mg), Tris-HCl (6,05 mg dans 75 mL d'eau distillée + 5 mL d'HCl)	Non	412 nm	$[\text{OSCN}^-] (\mu\text{M}) = (\Delta A_{412} \times V_{\text{total}} (\text{ml})) / (S \times l \times 2 \times V_{\text{échantillon}} (\text{ml})) \times 10^3$ (d'après la loi de Beer Lamber : $A = S \times l \times C$)
Bosch et al., 2000	Nbs ₂ (20 mg), DETAPAC (1mmole), 2-mercaptoethanol (0,6mM), tampon phosphate pH 7,2 (50 mL)	Tampon Chlorure de potassium (1,95 g.L ⁻¹ de Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O + 0,89 g.L ⁻¹ de NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + 8,19 g.L ⁻¹ de NaCl)	409 nm	$[\text{OSCN}^- + \text{OI}^-] = 4,5 (A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}) / 0,01405 \times 2 \times V_{\text{échantillon}}$
Aune et Thomas, 1977	tampon phosphate pH 6,6 (50 mM), Borohydrate de sodium (2 M), EDTA (5 mM)	non	412 nm	Aucune indication
Tenovuo et al., 1981	Aucune indication	Aucune indication	412 nm	Aucune indication
Thomas et al., 1980	TNB (1 mM), Tris-HCl pH 7 (0,5 M), borohydrate de sodium	non	412 nm	Aucune indication

V. Analyses Microbiologiques

V.1. Les milieux de culture

V.1.1. Potato Dextrose Agar (PDA) (DIFCO, Le Pont de Claix, France)

Il s'agit d'un milieu de culture solide, servant à la culture de levures et de champignons dans les aliments et les produits laitiers. Dans notre cas, il servira à la culture de nos souches fongiques. Sa composition par litre est de 4 g de fécule de pomme de terre, 20 g de dextrose et de 15 g d'agar. On suspend 39 g de milieu déshydraté PDA dans un litre d'eau distillée. Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 min. Le pH final du milieu est de $5 \pm 0,2$.

V.1.2. Potato Dextrose Broth (PDB)

Il s'agit d'un milieu de culture microbiologique utilisé pour les cultures en milieu liquide de levures et de champignons. Il a la même composition que le PDA, exception faite qu'il ne contient pas d'agar. On suspend 24 g de milieu déshydraté de PDB dans un litre de tampon citrate/phosphate (pH 5,5). Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 min.

V.2. Les diluants

V.2.1. Eau peptonée

Les peptones tryptiques sont un apport en azote. La composition est simple : peptone exempt d'indole 15 g.L⁻¹, NaCl 5 g.L⁻¹.

Le milieu est préparé en ajoutant 15 g de milieu déshydraté à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5,5. L'eau peptonée est stérilisée à 121°C pendant 15 min.

V.2.2. Eau physiologique + Tween 80

C'est une solution isotonique à 9 ‰ (w/v) de NaCl à pH de 7,0–7,2 stérilisée à 121°C pendant 15 min, qui permet de préserver le volume cellulaire. Dans notre cas, nous rajoutons 0,05% (v/v) de Tween 80. Il s'agit d'un mouillant qui aura pour rôle d'éviter aux conidies des champignons de s'agglomérer entre elles (de Wit et van Hooydonk, 1996).

V.3. Inoculum

V.3.1. Inoculum utilisé pour l'étude la croissance des espèces fongiques en milieu de culture liquide PDB

L'inoculum est une suspension de conidies fongiques. Il contient 10^6 conidies/mL pour les espèces de *Colletotrichum* (C 62 et Co CMR 55) et 10^4 pour *Fusarium sp.* Les milieux sontensemencés à hauteur de 3% (v/v) de suspension de conidies.

L'inoculum est préparé en déposant 10 mL d'eau physiologique (9 g.L⁻¹ de NaCl) + 0,05% (v/v) de tween 80 à la surface du mycélium d'une espèce fongique âgée de 7 à 10 jours. La surface du mycélium ainsi mouillée est raclée à l'aide d'un étaleur stérile. La suspension est récupérée à l'aide d'une pipette stérile et est ensuite filtrée sur un filtre standard plissé (Ø 150 mm), afin d'éliminer le mycélium et les résidus de milieu de culture, puis, est homogénéisée à l'aide d'un Vortex.

La charge de la suspension est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez, au microscope optique au grossissement 400. Le nombre de conidies.mL⁻¹ est donné par la formule suivante : $N = x \cdot 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$ où x est la moyenne de conidies comptées dans au moins 5 rectangles de la cellule de Malassez.

V.3.2. Inoculum utilisé pour l'étude de la croissance des espèces fongiques en milieu de culture solide PDA

L'inoculum consiste en un disque de mycélium fongique de 5 mm de diamètre pris sur une culture de 7 jours. Les cultures utilisées ont été obtenues à partir de mycélium purs de souches microbiennes, conservées à -80°C dans du glycérol 15% (v/v). Pour se faire, on inocule à l'aide d'une anse stérile un morceau de mycélium (conservé dans du glycérol 15% (v/v)) sur du milieu PDA. L'incubation dure 3 jours à l'obscurité à 30°C dans une étuve. Après les 3 jours d'incubation, on peut observer le développement mycélien suivi de la sporulation (en fonction des espèces). On repique le mycélium sur un autre milieu de culture PDA. On prélève à l'aide d'une anse stérile un morceau gélosé de PDA avec du mycélium que l'on inocule sur du milieu PDA en boîte de Pétri. On incube à 30°C dans une étuve pendant 7 jours.

V.4. Etude de l'activité antifongique du Système lactoperoxydase et de la lactoferrine

V.4.1. Etude de l'activité antifongique du Système lactoperoxydase par la méthode de la biomasse

V.4.1.1. Etude de l'effet de différents Systèmes lactoperoxydase sur la croissance des espèces pathogènes fongiques

a. Différents Systèmes LPS étudiés

Après la détermination des concentrations des différents constituants du LPS, l'effet antimicrobien de différents LPS a été testé. Il s'agit de :

- LPS natif : avec les concentrations déterminées
- LPS-2G : avec la concentration en glucose doublée
- LPSI : LPS natif + 0,3 mM (49,8 mg) d'iode
- LPI : dans ce cas, le thiocyanate du LPS natif est substitué par de l'iode à 0,3mM

b. Préparation des Systèmes Lactoperoxydase

Dans un erlenmeyer contenant un litre d'eau distillée stérile, on introduit aseptiquement et dans l'ordre suivant chacun des composants du système : glucose, glucose oxydase, thiocyanate de sodium et lactoperoxydase. Chaque composant est rajouté 2 min après le composant précédent. Après l'ajout de l'enzyme lactoperoxydase, un délai de 5 min est observé avant la récupération de la solution de LPS pour les analyses.

c. Etude la croissance des espèces pathogènes fongiques par biomasse

Dans un erlenmeyer de 250 mL, 75 mL de PDB stérile, dont le pH a été stabilisé à 5,5 à l'aide de tampon citrate/phosphate ($C_6H_8O_7.H_2O$ 0,2M et $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0,2M), sont introduits ; Le Système Lactoperoxydase est ajouté aseptiquement. La solution est stérilisée par filtration sur filtre de 0,45µm stérile. Introduire ensuite 3% v/v de suspension de conidies (10^6 conidies.mL⁻¹) dans les erlenmeyers. Le tout est maintenu à 30°C dans un bain-marie avec une agitation de 140 trs.min⁻¹. Des erlenmeyers témoins sont préparés en ne rajoutant pas le Système Lactoperoxydase.

Pour chaque souche on fait les mêmes préparations que précédemment.

Après respectivement 0, 18, 24 h, 5 mL du contenu des erlenmeyers est filtré sur des membranes stériles de 0,45 µm préalablement séchées à 105°C pendant 1 h et tarées.

Les membranes contenant le mycélium sont séchées à l'étuve à 105°C pendant 24 h. Elles sont ensuite pesées à 10^{-4} g près jusqu'à l'obtention d'une masse constante. On effectue 3 répétitions par traitement et par temps de traitement.

V.4.2. Etude de l'activité antifongique de la lactoferrine par turbidimétrie

La lactoferrine bovine nous a été fournie par DMV. Elle possède les caractéristiques suivantes :

Pureté : 96%

Protéines : 93%

Solubilité : 80%

V.4.2.1. Préparation de la lactoferrine.

L'eau peptonnée a été utilisée comme diluant. Deux concentrations de lactoferrine ont été choisies : 10 et 30 mg.L⁻¹. Ces concentrations ont été choisies en accord avec les travaux de Soukka *et al.* (1992) sur l'effet de la lactoferrine humaine sur *Candida albicans*. Les solutions de lactoferrine ont été préparées avec de l'eau ultra pure (millipore) pour éviter toute interaction avec d'autres composés ou ions. Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec de l'acide citrique (0,1M). La solution ainsi préparée est stérilisée par filtration sur filtre stérile de 0,45 µm et introduite dans un erlenmeyer stérile.

V.4.2.2. Etude l'activité antifongique de la lactoferrine par turbidimétrie

Les pathogènes étudiés sont ensuite mis en culture dans la solution de lactoferrine comme décrit pour la méthode de la biomasse. Par contre dans ce cas, le suivi de la croissance se fait par la méthode de la turbidimétrie. Au bout de respectivement 0, 18 et 24 h, 1 mL de chaque erlenmeyer est prélevé pour une lecture au turbidimètre à 600 nm. Trois répétitions par traitement et par espèces ont été réalisées.

V.5. Etude de l'effet de l'huile de Neem sur la croissance des espèces pathogènes fongiques

V.5.1. Effet des volatiles de l'huile de Neem sur la croissance des espèces pathogènes fongiques

Sur du milieu PDA en boîte de Pétri, on inocule un disque de mycélium (5 mm de diamètre) du pathogène âgé de 7 jours (tableau XIII). Dans le couvercle de la boîte de Pétri, on fixe, à l'aide de glycérol, une lame de microscope, sur laquelle a été déposée 2, 4, 6, 10 20, 40 et 100 µL d'huile de Neem issue de différents types d'extraction (pression à froid, Soxhlet et huile commerciale) selon la méthode de Régnier *et al.* (2007). Le tout est ensuite scellé à l'aide de parafilm et mis à l'étuve à 30°C (figure 19).

Trois répétitions par type d'huile ainsi qu'un témoin sans traitement ont été réalisés. Au bout de respectivement 2 et 7 jours, le diamètre de croissance du mycélium est mesuré. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule suivante :

$[(C-T)/C]*100$ (Plaza *et al.*, 2004), où C représente le diamètre de croissance du pathogène dans les boîtes témoins et T le diamètre de croissance du pathogène dans les boîtes avec présence de traitement.

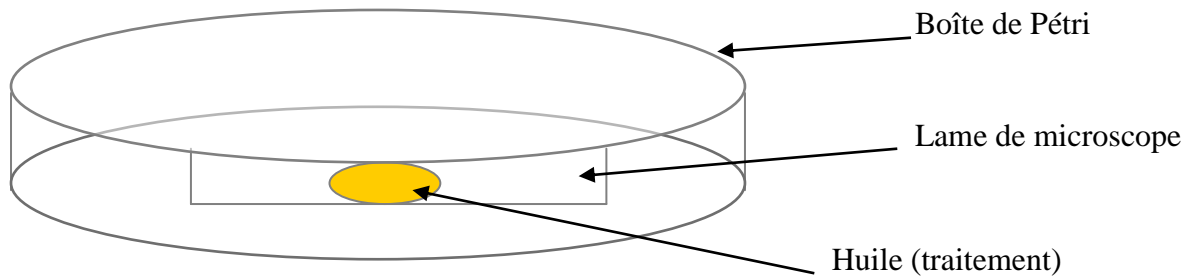


Figure 19 : Illustration d'une boîte de Pétri avec de l'huile de Neem posée sur une lame de microscope sur le couvercle.

V.5.2. Effet de l'incorporation d'huile de Neem dans le milieu de culture sur la croissance des souches pathogènes fongiques

Dans du milieu de culture PDA préalablement autoclavé auquel a été rajouté 0,05% (v/v) de Tween 80, on incorpore stérilement 0,5 ; 1 ou 2% (v/v) d'huile de Neem, afin de déterminer la dose de traitement. La gélose ainsi préparée est coulée en boîte de Pétri. On inocule au centre de la gélose ainsi préparée un disque de mycélium, de 5 mm de diamètre, du pathogène âgé de 7 jours. Trois répétitions par traitement ont été réalisées. Le diamètre de croissance des champignons mesuré tous les jours pendant 5 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule suivante :

$[(C-T)/C]*100$ (Plaza *et al.*, 2004), où C représente le diamètre de croissance du pathogène dans les boîtes témoins et T le diamètre de croissance du pathogène dans les boîtes avec présence de traitement.

VI. Etude de l'antracnose de blessure de banane

Le protocole utilisé est celui décrit par de Lapeyre de Bellaire *et al.* (2008).

- Réalisation d'une solution de conidies de *Colletotrichum musae* calibrée à 10^6 conidies.mL⁻¹

- Décontamination des fruits à l'éthanol 70% (v/v)
- Découpe de bouquets de 4 doigts de banane (2 au rang interne et 2 au rang externe)
- Délimitation par quatre points au marqueur indélébile de l'aire d'inoculation (surface d'1 cm² au niveau de la face latérale d'un doigt au rang externe)
- Inoculation de 2 doigts par dépôt de 25 µL de la suspension de conidies au niveau de l'aire d'inoculation
- Recouvrement de la gouttelette par un disque de papier filtre, puis d'un bout de coton humide stérile, puis de film plastique (afin de conserver l'humidité)
- Stockage des fruits à 25°C durant 48 h
- Blessure des fruits au niveau de l'aire d'inoculation à l'aide du pénétromètre équipé d'un embout de surface 1 cm² (la vitesse de l'embout est de 5 mm.sec⁻¹, la compression dure 4 sec)
- Réalisation des traitements par trempage
- Conditionnement des bouquets d'un même traitement dans un polybag perforé et stockage à 20°C pendant 10 jours (simulation du transport par bateau)
- 10 jours après inoculation, apparition de lésions d'anthracnose en forme d'ellipse :
Mesure de la surface de lésion grâce à la formule $SL = \text{longueur} \times \text{largeur} \times \pi/4$.

Dix répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

Les traitements étudiés sont regroupés dans le tableau XVIII.

Tableau XVII : Différents traitements étudiés pour l'anthracnose de blessure.

Traitements	Codes
Témoin	Ti
Témoin iode	T iode
Tecto 20 S	TBZ
LPS	
LPSI	
LPI	
LPS + Huile de Neem Sénégal	LPS + NS
LPS + Huile de Neem Cameroun	LPS + NC
LPS + Huile de Neem Inde	LPS + NI
Huile de Neem Sénégal	NS
Huile de Neem Cameroun	NC
Huile de Neem Inde	NI
Bioxeda	

Analyses statistiques

Le traitement des résultats se fait par analyse de la variance (**ANOVA**) (**P = 0,05**) et les moyennes ont été comparées par le test de Bonferroni. Toutes ces analyses ont été faites avec le logiciel XLSTAT (Addinsoft version 2009.4.07, Paris, France).

Résultats et discussion

I. Etude des potentialités d'utilisation du système Lactoperoxydase

I.1. Optimisation du LPS

Le but de cette étude est de déterminer qu'elles sont les conditions qui permettent au système lactoperoxydase d'avoir la cinétique de production d'ions OSCN^- la plus élevée tout en utilisant les quantités les plus faibles de réactifs, Pour se faire, nous avons mesurer la vitesse d'apparition des ions OSCN^- pour trois conditions opératoires différentes (tableau XVIII), à savoir :

Tableau XVIII : Conditions opératoires.

Système 1 (a) (Bosch et al. , 2000)	
Lactoperoxydase	30 mg.L ⁻¹
Thiocyanate de sodium	1 mM (90 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	100 UI/L (1,79 mg.L ⁻¹)
Glucose	100 mM (18 g.L ⁻¹)
Système 2 (b) (Adolph et al. , 2006)	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Thiocyanate de sodium	0,5 mM (45 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	8 mM (1,44 g.L ⁻¹)
Système 3 (c) (Boussouel et al. 1999)	
Lactoperoxydase	35 mg.L ⁻¹
Thiocyanate de sodium	25 mg.L ⁻¹
Glucose oxydase	1 mg.L ⁻¹
Glucose	0,2 g.L ⁻¹

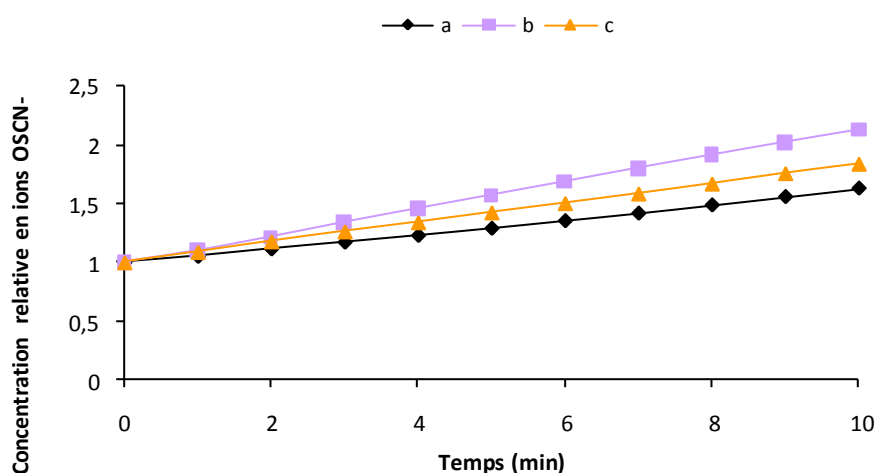


Figure 20 : Evolution de la concentration relative (Concentration à l'instant T/Concentration initiale) en ions OSCN^- pendant 10 min des LPS.

a (**Bosch et al.**, 2000), b (**Adolph et al.**, 2006)et c (**Boussouel et al.** 1999).

Tableau XIX : Tableau récapitulatif des caractéristiques (concentrations des réactifs et conditions d'utilisation) de différents Systèmes lactoperoxydase utilisées dans la littérature.

[GOD]	[LPO]	[Glucose] (mM)	[SCN] (mM)	pH	Milieu de culture	Temp. (°C)	Références
2 mg.L ⁻¹ (282 ULL ⁻¹)	20 mg.L ⁻¹ (8000 ULL ⁻¹)	13,89	0,25	6,6	lait	4 et 15	Denis et Ramet (1989)
100 ULL ⁻¹	14000 ULL ⁻¹	16,67	0,224 ou 2,240	np	Peptone-YE	37	Dionysius <i>et al.</i> (1992)
984 ULL ⁻¹	19 mg.L ⁻¹	21,11	Np	7,8	THB	0, 6 et 12	Kennedy <i>et al.</i> (2000)
100 ULL ⁻¹	30 mg.L ⁻¹	104,44	1	5,0	TSA	35	Bosch <i>et al.</i> (2000)
112,5 ULL ⁻¹	5040 ULL ⁻¹	1,11	0,25	6,4	lait	25	Boussouel <i>et al.</i> (2000)
LPO activité/11,9	187,5 mg.L ⁻¹	22,22	5	7,8	THB	37	Mclay <i>et al.</i> (2002)
LPO activité/11,9	0,5 mg.L ⁻¹	0,07	0,073	6,5 à 7,8	TSB, THB, BHI ou Bouillon M17	37 ou 42	Dufour <i>et al.</i> (2003)
1,5 mg.L ⁻¹ (85,5 ULL ⁻¹)	25 mg.L ⁻¹ (3927,5 ULL ⁻¹)	8,33	0,5	6,5	Tampon phosphate (0,1 mol)	4 et 25	Adolphe <i>et al.</i> (2006)

Les trois systèmes choisis différents de part leur concentration en glucose et en thiocyanate de potassium. La figure 20 représente l'évolution de la concentration relative (Concentration en OSCN⁻ à l'instant T/Concentration initiale) en ions OSCN⁻ pendant 10 minutes.

Le système Lactoperoxydase b présente la cinétique de production des ions OSCN⁻ la plus rapide suivi du système c et enfin du système a. D'après Adolph *et al.* (2006) pour optimiser la peroxydation de l'ion thiocyanate, deux facteurs très importants sont à prendre en compte : la concentration en glucose (premier facteur) et la concentration en lactoperoxydase (second facteur). Dans notre cas, les concentrations en lactoperoxydase sont similaires pour les trois systèmes étudiés. Néanmoins l'activité de la lactoperoxydase dépend d'après Kohler et Jenzer (1989) et Wiit et van Hooydonk (1986) de deux conditions :

- une concentration suffisante en ions thiocyanate a pour incidence une activité optimale de la lactoperoxydase, en revanche, une concentration insuffisante d'ions thiocyanate peut entraîner une inactivation réversible de la lactoperoxydase
- un excès de peroxyde d'hydrogène a pour effet d'inactiver la lactoperoxydase de manière réversible et/ou irréversible.

C'est sans doute ces conditions qui expliquent que le système a donne la cinétique de production des ions OSCN⁻ la moins rapide.

Au vu de ces résultats, nous avons donc choisi d'utiliser les conditions opératoires qui caractérisent le système b pour la suite de notre étude. Ces conditions sont d'autant plus

favorables qu'elles mobilisent de faibles concentrations en réactifs et substrats. Ce choix est conforté par le fait que les informations relatives au système c (Boussouel *et al.*, 1999) ne sont pas précises. Ainsi les unités (concentration et activité enzymatique) utilisées pour caractériser les préparations enzymatiques de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase ne sont pas standardisées. En effet, Boussouel *et al.* (1999) ne précisent pas l'activité des enzymes (lactoperoxydase et glucose oxydase) utilisées et de ce fait ne nous permettent pas de les comparer avec celles que nous avons utilisées. De plus de manière générale dans la littérature, la comparaison entre les différents systèmes lactoperoxydase (tableau XIX) est difficile. En effet la pureté des enzymes utilisées n'est pas mentionnée et la concentration des composants des systèmes lactoperoxydase varie considérablement ou n'est pas précisée. Dionysius *et al.* (1992) et McLay *et al.* (2002) ont utilisé des concentrations en lactoperoxydase très élevées respectivement 14000 UI.L^{-1} et $187,5 \text{ mg.L}^{-1}$ en opposition à Kennedy *et al.* (2000) et Dufour *et al.* (2003) qui ont utilisé des concentrations en lactoperoxydase moins élevées respectivement 19 et $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ mais dans ce dernier cas de figure, l'activité des enzymes lactoperoxydase utilisées n'est pas précisée, ce qui rend la comparaison impossible. Il y a également des différences de concentration pour les autres constituants du système lactoperoxydase ; dans tous les cas, les concentrations en glucose oxydase de la littérature sont plus élevées que celle du système lactoperoxydase b (celui que nous avons choisi pour la suite de notre étude). Lorsque l'on compare les ratios (glucose/GOD, SCN/LPO), nous constatons que seul le système lactoperoxydase utilisé par Denis et Ramet (1989) est très similaire au système lactoperoxydase b. De plus les expérimentations mentionnées dans la littérature ont été réalisées dans des milieux de cultures microbiologiques ou dans du lait, sauf pour Adolph *et al.* (2006) qui comme dans notre cas a réalisé son étude dans du tampon (tampon phosphate, 0,1 M). Ces conditions pourraient interférer sur l'efficacité du système lactoperoxydase. Pour terminer, les températures et les pH de travail sont également différents d'un auteur à l'autre.

Comme nous l'avons dit plus haut, nous avons choisi le système b pour la suite de notre étude. Nous allons tester l'efficacité de ce système vis-à-vis de la croissance de trois pathogènes de la banane.

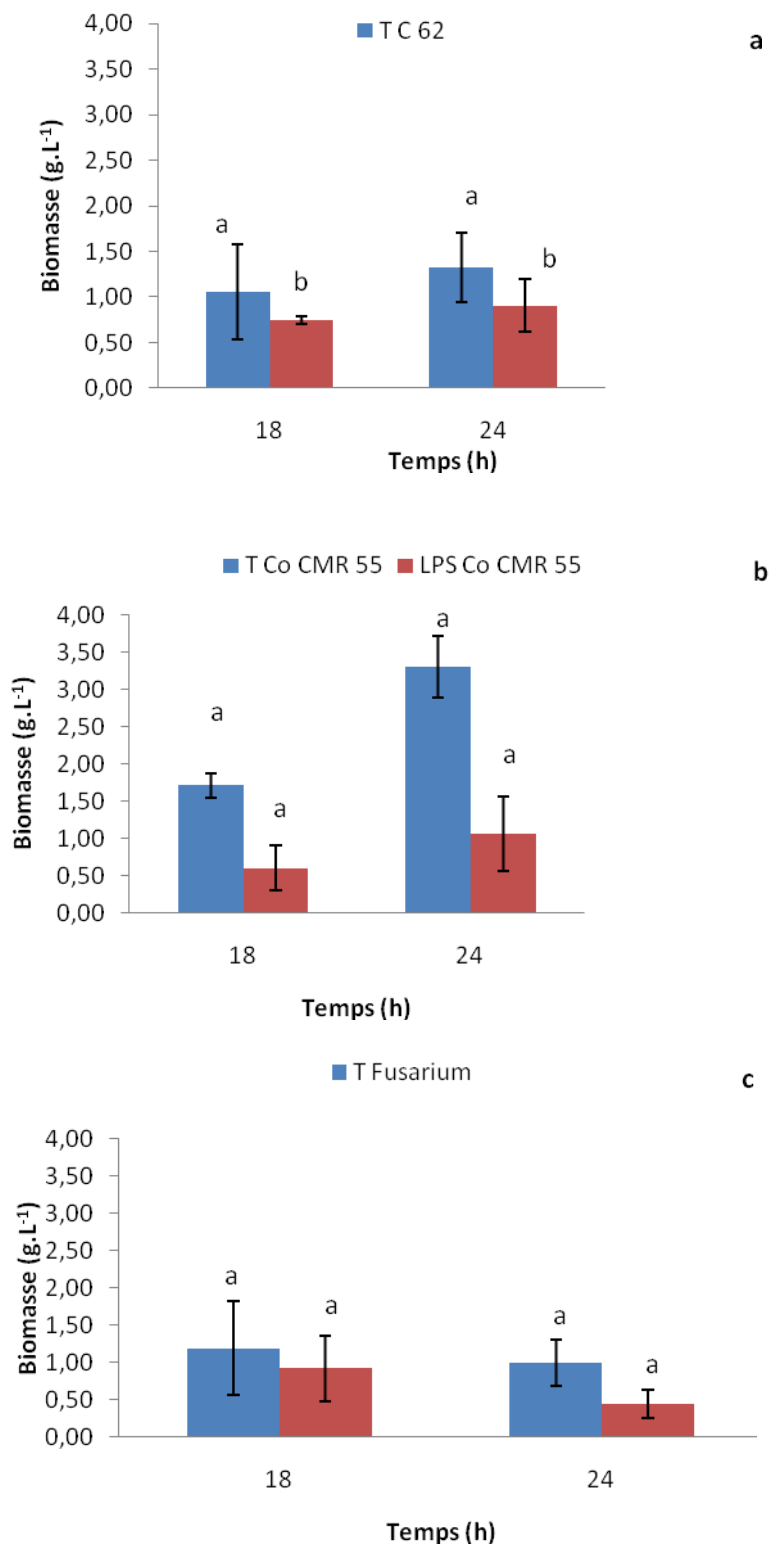


Figure 21 : Effet antifongique du Système lactoperoxydase sur *Colletotrichum musae* C 62 (a), *Colletotrichum* sp. (b) et *Fusarium* sp. (c) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min)

I.2. Effet du LPS sur la croissance de différentes espèces fongiques pathogènes de la banane lors de culture en milieu liquide

Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 21. On observe une inhibition de la croissance due au LPS de toutes les espèces fongiques testées. L'espèce la plus sensible à l'effet du LPS est la souche *Colletotrichum sp.* Co CMR 55 suivie de la souche *Fusarium sp.*, elle-même plus sensible que la souche *Colletotrichum musae* C 62. Pour la souche Co CMR 55, le traitement au LPS conduit à un niveau d'inhibition de 68% après 24 h de culture dans du milieu PDB. Pour les deux autres souches, l'effet du traitement n'est pas significatif. La réponse des pathogènes n'est donc pas la même. Cette réponse dépend du niveau de sensibilité des pathogènes. On pourrait donc dire que la souche C 62 est plus résistante que la souche Co CMR 55. Effet de Lapeyre et Dubois (1997) ont démontré qu'il existe certaines souches de *Colletotrichum musae* qui sont plus résistantes que d'autres à Thiabendazole. Cela nous conforte dans notre hypothèse selon laquelle les pathogènes ne réagissent pas de la même manière aux traitements.

Ces différentes réponses au traitement par le LPS signifient que le système utilisé n'est pas suffisamment efficace vis-à-vis de nos pathogènes, aussi avons-nous choisi de le modifier pour en améliorer l'efficacité. Les modifications apportées au système sont présentées dans le tableau XX. En effet, Lehrer (1969) affirme qu'un système lactoperoxydase pour lequel l'ion iode est le donneur d'électron a un effet antifongique, d'où les modifications apportées à notre système de base. Ces différents systèmes ont été testés vis-à-vis des trois souches déjà utilisées. La figure 22 montre les résultats obtenus.

Tableau XX : Caractéristiques des différents LPS modifiés utilisés
contre les trois espèces fongiques pathogènes.

LPS natif	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Thiocyanate de sodium	0,5 mmol/L (45 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	8 mmol/L (1,44 g.L ⁻¹)
LPS 2G	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Thiocyanate de sodium	0,5 mmol/L (45 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	16 mmol/L (2,88 g.L ⁻¹)
LPSI	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Thiocyanate de sodium	0,5 mmol/L (45 mg.L ⁻¹)
Iodure de potassium	0,3 mmol/L (49,8 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	8 mmol/L (1,44 g.L ⁻¹)
LPI	
Lactoperoxydase	3927,5 UI (33 mg.L ⁻¹)
Iodure de potassium	0,3 mmol/L (49,8 mg.L ⁻¹)
Glucose oxydase	85,5 UI/L (1,53 mg.L ⁻¹)
Glucose	8 mmol/L (1,44 g.L ⁻¹)

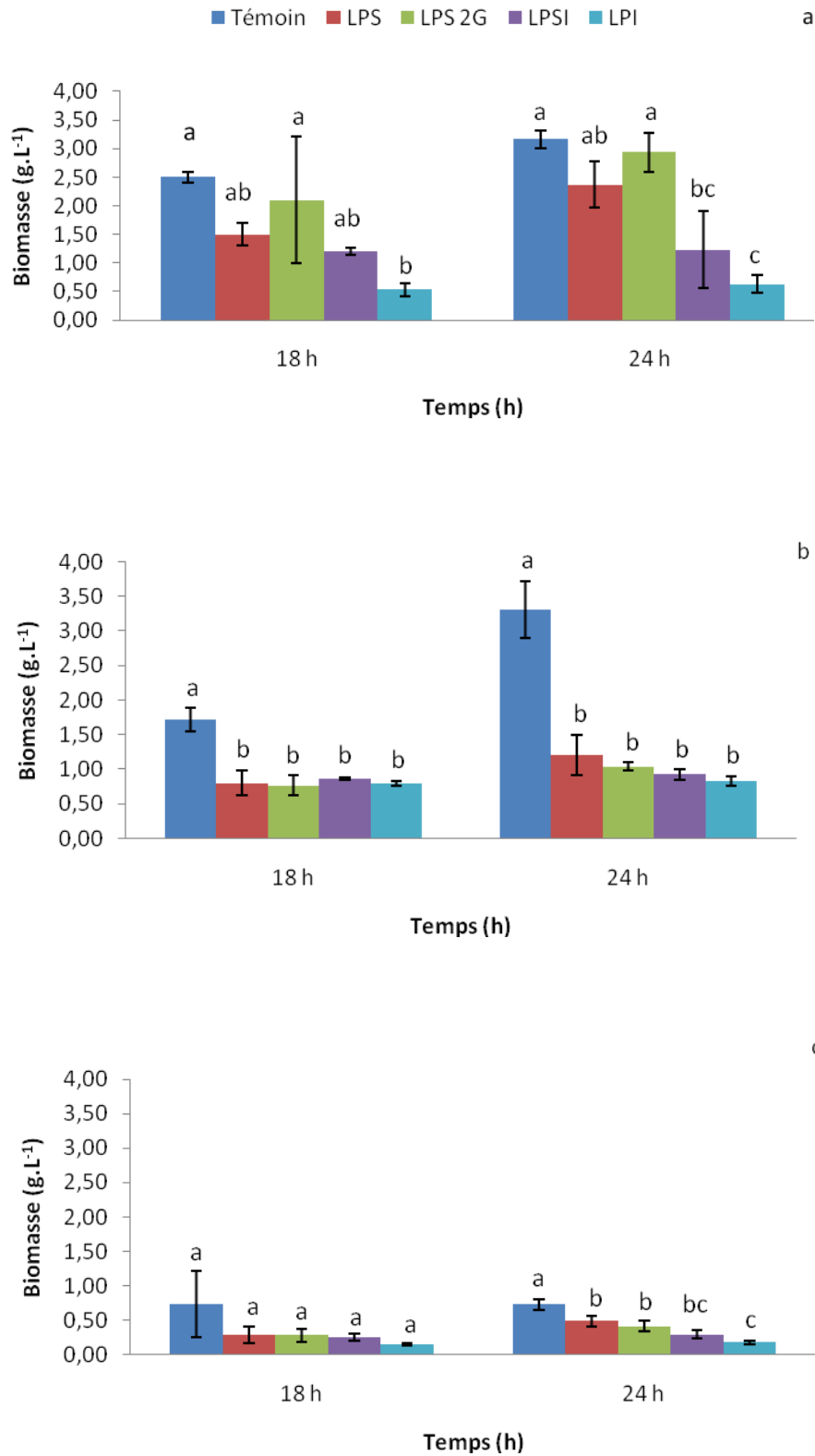


Figure 22 : Effet des Système lactoperoxydase modifiés *Colletotrichum musae* C 62 (a), *Colletotrichum* sp. (b) et *Fusarium* sp. (c) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min)

On observe que le traitement LPI conduit aux biomasses les plus faibles après 18 h et 24 h quelque soit la souche étudiée. Par contre, l'efficacité des autres systèmes varie d'une souche à l'autre. L'inhibition de la croissance est par ordre décroissant LPI > LPSI > LPS2G > LPS > Témoin pour les souches Co CMR 55 et pour *Fusarium sp.* (figures 22a et c), et LPI > LPSI > LPS > LPS2G > Témoin pour la souche C 62 (figure 22b) en matière de production de biomasse. Pour cette souche (C 62), il y a une différence significative avec le traitement LPI et tous les autres traitements et il n'y a pas de différence significative entre le témoin et le traitement LPS2G. En ce qui concerne la souche Co CMR 55 de *Colletotrichum sp.*, il existe une différence significative entre le témoin et les autres traitements après 24h, mais pas de différence significative entre les différents traitements, même si le traitement LPI produit les biomasses les moins élevées.

Après 24 h, lorsqu'on repique les souches traitées par le LPI sur du milieu PDA, il n'y a pas de reprise de la croissance des souches. Nous en déduisons que ce système a un effet fongicide sur les souches. L'ion I^- est donc plus oxydable que l'ion SCN^- . Avec le traitement LPSI, on observe un ralentissement de la croissance mais pas un effet fongicide. Nous en déduisons que le système LPSI est fongistatique et que le système LPI est fongicide. Thomas (1985) et Guthrie (1992) sont parvenus aux mêmes conclusions.

Compte tenu de ces résultats, nous nous sommes posé la question de la toxicité de l'iode pour les consommateurs des bananes traitées. Dans les systèmes LPI et LPSI, nous sommes à des doses en iode (iodure) assez faibles (300 μM d'iodure de potassium). Dans le sel de cuisine, la réglementation préconise de 10 à 15 mg d'iodure de potassium/Kg de sel. De plus, dans le système LPI, ce n'est pas l'iode qui a une action antimicrobienne mais c'est le produit de la réaction entre l'iode et le peroxyde d'hydrogène, en l'occurrence l'ion OI^- qui a des propriétés antimicrobiennes. L'utilisation de l'iode, sous forme d'iodure de potassium, à la place du thiocyanate dans le système lactoperoxydase a été étudiée contre les bactéries buccales par les dentistes. En effet, Ihalin *et al.* (2003) ont testé 3 concentrations d'iode (50, 500 et 5000 μM) sous forme d'iodure de potassium dans système lactoperoxydase contre *Fusobacterium nucleatum*. D'après ces mêmes auteurs, les composés produits par le système LPI, en l'occurrence les ions OI^- ont un effet antimicrobien plus important que les ions $OSCN^-$. Les moindres résultats obtenus avec le LPSI peuvent aussi s'expliquer par le fait que le thiocyanate réduit l'action antimicrobienne du système LPSI en étant en compétition avec l'iode pour la réaction d'oxydation. En effet, le thiocyanate et l'iode se fixent sur la même position sur la molécule de LP, ce qui crée une compétition qui diminue l'efficacité du système lactoperoxydase.

Compte tenu de ces informations, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations d'iodure de potassium (KI) (10, 50, 100 et 300 μM) dans les systèmes LPSI et LPI sur la croissance de *Colletotrichum musae* C 62. Les figures 23a et b présentent les résultats obtenus pour ces traitements. Le choix des concentrations testées est basé sur des données de la littérature et le fait que 10 μM représentent la concentration de la salive en ion I^- (Ihalin, 2003).

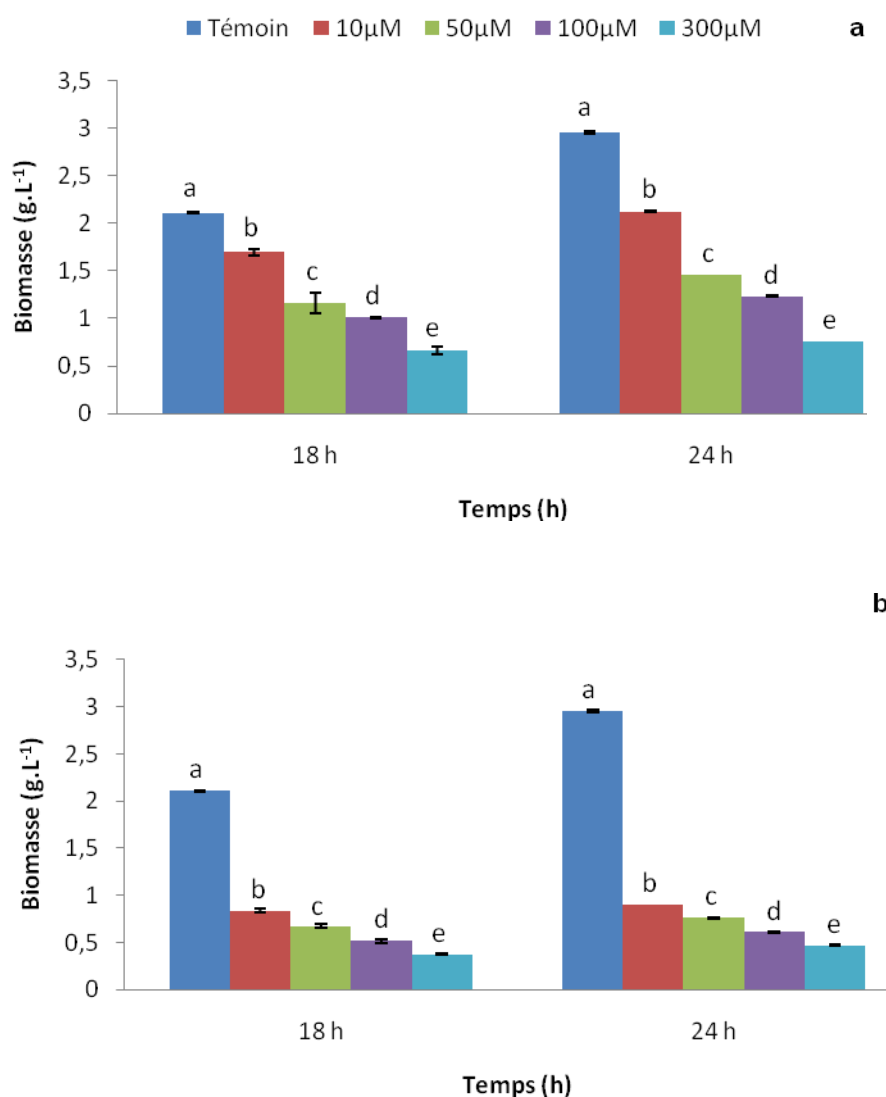


Figure 23 : Effet des Systèmes LPSI

(a) et LPI (b) à différentes concentrations en iodure de potassium sur la biomasse de *Colletotrichum musae* C 62 après 18 h et 24 h de culture en milieu liquide PDB à 30°C sous agitation (140 trs.min⁻¹).

Les résultats obtenus confirment ceux obtenus précédemment à savoir que le système LPI est plus efficace et conduit à une inhibition plus importante que le système LPSI quelles que soient la durée de la culture et la concentration d'iodure de potassium utilisées. Pour les deux systèmes, les concentrations d'iodure de potassium élevées inhibent davantage la croissance de la souche. Les différences observées sont significatives d'une concentration à une autre. Il est intéressant de constater que la plus petite concentration entraîne un niveau d'inhibition élevée, cela permettra d'adapter la composition du système LPI aux exigences des toxicologues pour une utilisation sur des aliments.

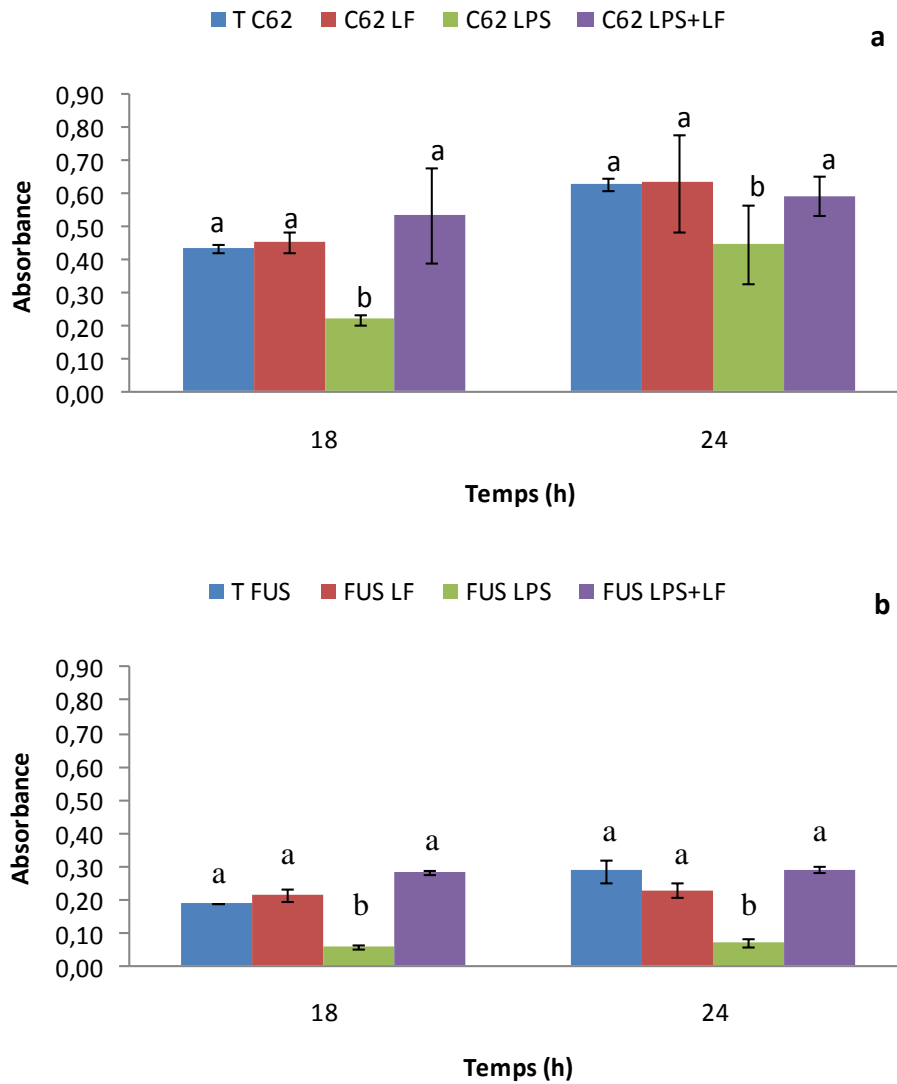


Figure 24 : Effet de la LF, LPS et LF/LPS sur la croissance de *Colletotrichum musae* C 62 (a) et *Fusarium sp.* (b) après 18 h et 24 h de culture dans du milieu PDB à 30°C sous agitation (140 trs/min) et mesurée par turbidimétrie.

II. Etude des potentialités d'utilisation de la Lactoferrine et du Bioxeda® contre les espèces fongiques pathogènes de la banane

Les résultats obtenus avec le système LPS ont démontré l'efficacité de ce système vis-à-vis des espèces fongiques pathogènes testées. Cependant, il nous a paru intéressant d'explorer les potentialités de combinaisons de traitements utilisant des molécules naturelles connues pour leurs activités antimicrobiennes. Parmi les molécules décrites pour avoir des propriétés antimicrobiennes, il nous a semblé que la lactoferrine (LF) devait être testée en association avec le système LPS. La même logique nous a conduit à tester l'efficacité du Bioxeda®, une formulation antimicrobienne à base d'eugénol.

II.1. Effet de la LF, du LPS et du couplage LPS/LF sur la croissance de *Colletotrichum musae* et de *Fusarium sp.*

L'effet de la LF seule ou en association avec le LPS a été étudié sur des cultures de *Colletotrichum musae* (C 62) et de *Fusarium sp.* Les résultats sont présentés dans la figure 24. Pour des raisons de quantité disponible de LF, l'effet de la LF sur la croissance des champignons a été étudié en milieu liquide agité et la croissance mesurée par turbidimétrie. Quelque soit le traitement appliqué, aucune différence significative de croissance n'est observée entre les témoins non traités et les essais de traitement à la lactoferrine seule ou en association avec le LPS, ce qui permet de déduire que la lactoferrine n'a aucune action antimicrobienne sur nos pathogènes dans les conditions opératoires utilisées. Cependant, Seachool et Krochta (2005), ont montré qu'une concentration de LF supérieure à 0,5 mg.mL⁻¹ dans de l'eau peptonnée 1%, inhibait la croissance de *Penicillium commune* après 2 jours de culture et que pour ce pathogène la MIC était de 10 mg.mL⁻¹. De plus, Murdock et Matthews (2002) ont également montré que la MIC de LF pour *Escherichia coli* O157 :H7, *Salmonella* Stanley, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* est compris entre 2 et 8 mg.mL⁻¹ pour une culture dans de l'eau peptonnée 1% contenant 0,025% (w/v) d'extrait de levure et 1% (w/v) de glucose. Nous en déduisons que nos pathogènes (*Colletotrichum musae* C 62 et *Fusarium sp.*) sont plus résistants à la LF que les pathogènes de ces expériences.

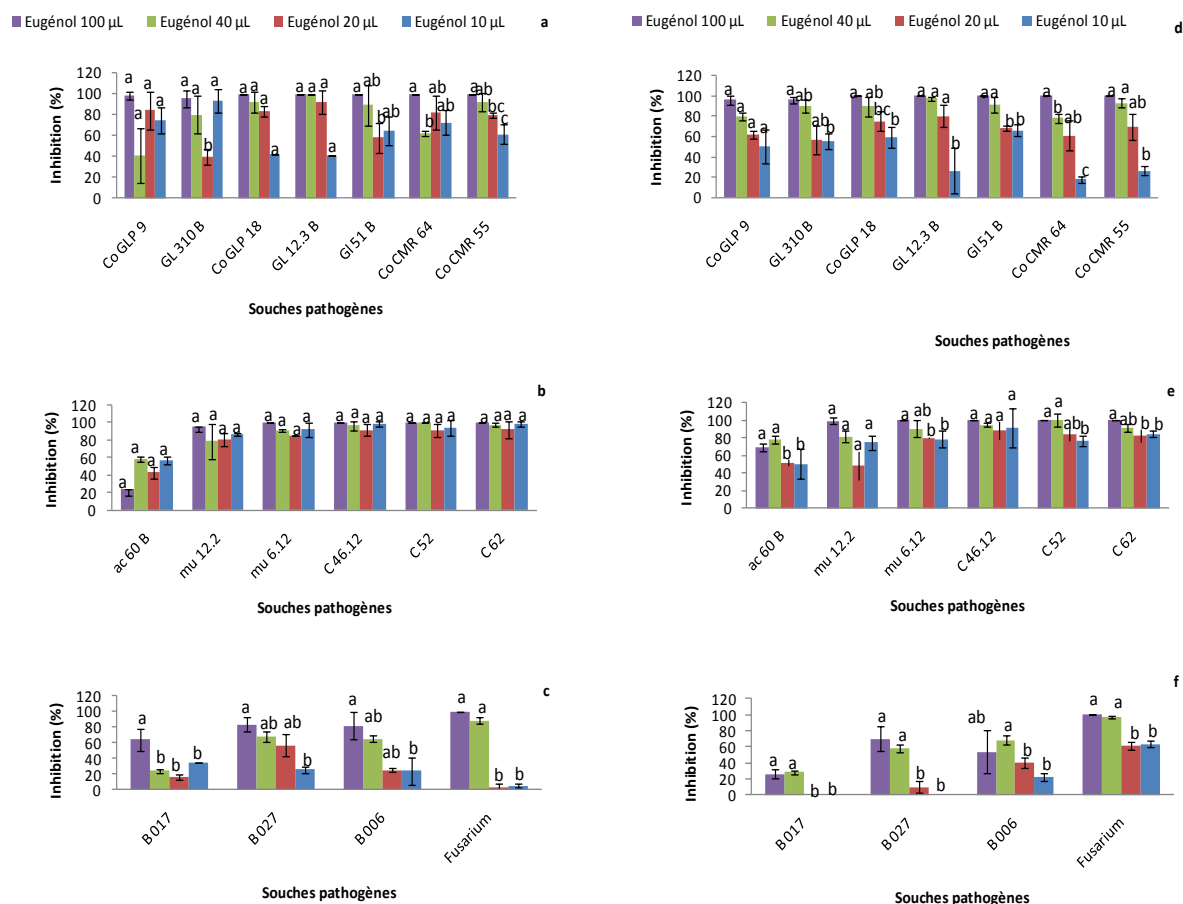


Figure 25 : Effet des volatiles de Bioxeda® sur la croissance de différentes souches fongiques pathogènes de banane après 2 jours (a, b et c) et 7 jours (d, e et f) de culture à 30°C sur milieu solide PDA.

II.2. Effet de traitement avec la formulation antifongique commerciale Bioxeda® sur la croissance d'espèces fongiques pathogènes de la banane

Nous avons testé l'effet de la formulation Bioxeda® (180 g d'eugénol.L⁻¹) sur nos pathogènes fongiques. Dans un premier temps nous avons testé l'effet des vapeurs de ce produit, puis ensuite, son effet direct en l'incorporant dans des milieux de culture à différentes concentrations.

II.2.1. Effet des vapeurs de Bioxeda sur la croissance des pathogènes de la banane

Concernant les effets des vapeurs de Bioxeda® sur la croissance de pathogènes fongiques de la banane, nous avons utilisé une collection de 17 souches pathogènes (Tableau XIII) pour des traitements à des doses croissantes de Bioxeda® de 10, 20, 40 et 100 µL par boîte de Pétri, ce qui correspond respectivement à 1,8 ; 3,6 ; 7,2 et 18 mg d'eugénol pour un volume d'espace de tête d'environ 44 mL (si on considère que dans chaque boîte de Pétri, 25 mL de gélose a été coulé). Les croissances des souches ont été quantifiées par la mesure du diamètre des colonies au bout de 2 jours et de 7 jours.

La figure 25 donne les pourcentages d'inhibition calculé pour toutes les souches au bout de respectivement 2 jours (figures 25 a, b et c) et 7 jours (figure 25 d, e et f) de culture sur milieu PDA à 30°C.

Après 2 jours de croissance, nous observons que la souche de l'espèce *Colletotrichum acutatum* (Ca) est la moins inhibée suivie respectivement par les souches du groupe *Lasidiplodia sp.* (Lsp) et *Fusarium sp.* (Fsp). L'inhibition la plus importante concerne le groupe des *Colletotrichum muase* (Cm) avec une moyenne supérieure à 90%. La dose de traitement de 100 µL de Bioxeda® donne le pourcentage d'inhibition le plus élevé sauf pour le groupe Ca (*Colletotrichum acutatum*).

Après 7 jours de culture, les résultats sont identiques à ceux déjà observés excepté pour l'inhibition la plus faible qui est observée dans ce cas pour le groupe Lsp (de l'ordre de 30%) et pour le groupe Fsp qui présente une inhibition plus importante de l'ordre de 80%. La dose de 100 µL conduit toujours aux inhibitions les plus importantes et ce quelque soit le groupe.

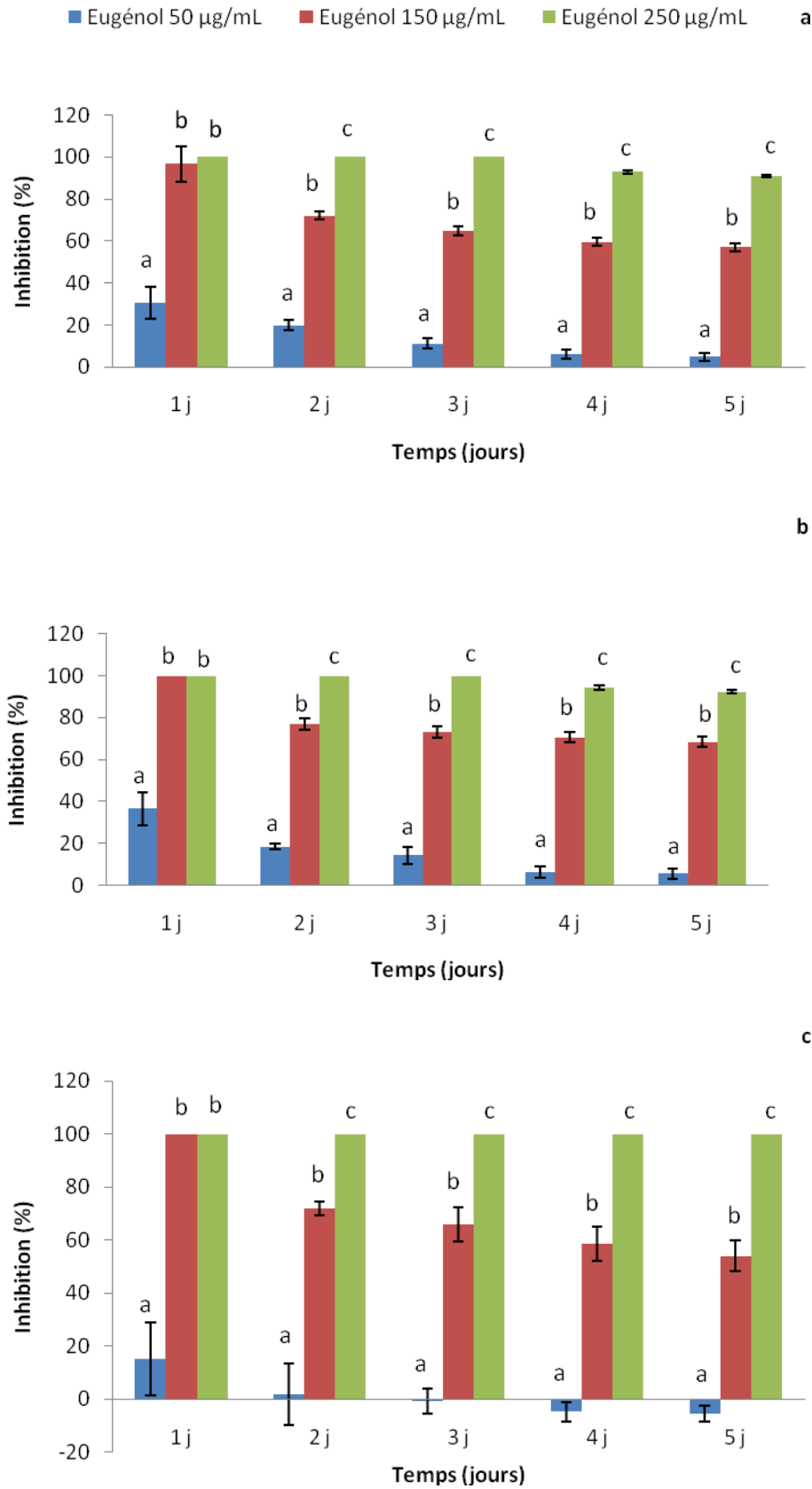


Figure 26 : Effet de différentes concentrations d'eugénol (Bioxeda®) incorporé dans du milieu de culture PDA sur la croissance de *Colletotrichum musae* C 62 (a), *Colletotrichum* sp. Co CMR 55 (b) et *Fusarium* sp. pendant 5 jours de culture à 30°C

II.2.2. Effet de la formulation Bioxeda® en incorporation directe dans de la gélose PDA sur la croissance des pathogènes de la banane

Pour cette étude, les trois souches fongiques utilisées sont : *Colletotrichum musae* (C 62), *Colletotrichum sp.* (Co CMR 55) et *Fusarium sp.* Trois concentrations différentes de Bioxeda® ont été testées. Ces concentrations ont été choisies de telle sorte qu'on ait respectivement en concentration finale 50, 150 et 250 µg d'eugénol.mL⁻¹ de milieu. La croissance des souches a été suivie par la mesure du diamètre du mycélium des souches pendant 5 jours. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 26.

Pour les trois souches étudiées, une inhibition significative est observée quand la concentration en eugénol augmente. La souche la plus sensible semble être la souche de *Fusarium sp.* Le comportement des deux autres souches est très semblable. Par contre, pour les souches C 62 et Co CMR 55 à la concentration de 250 µg.mL⁻¹, on observe un retard de sporulation des souches. Le repiquage des trois souches, sur du milieu de culture exempte de Bioxeda®, on constate une reprise de la culture, ce qui signifie que l'eugénol a un effet fongistatique sur les souches étudiées.

Barrera-Necha *et al.* (2009) ont montré une inhibition totale de la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli après 9 jours d'incubation à 25°C dans du milieu de culture PDA contenant respectivement 100, 150, 200, 250 et 300 ppm d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, plante dont le composé majoritaire est de l'eugénol. Ces concentrations correspondent à celles que nous avons testées. De plus, Goubran et Holmes (1993), rapportent un effet inhibiteur de l'eugénol sur la croissance des champignons *Monilia*, *Botrytis* et *Mucor*. Tripathi *et al.* (1985) obtiennent également à 250 ppm une inhibition totale de la croissance des souches *Alternaria alternata*, *Colletotrichum capsici* et *Sclerotium rolfsii*, pathogènes du Bétel (*Piper betle* L.).

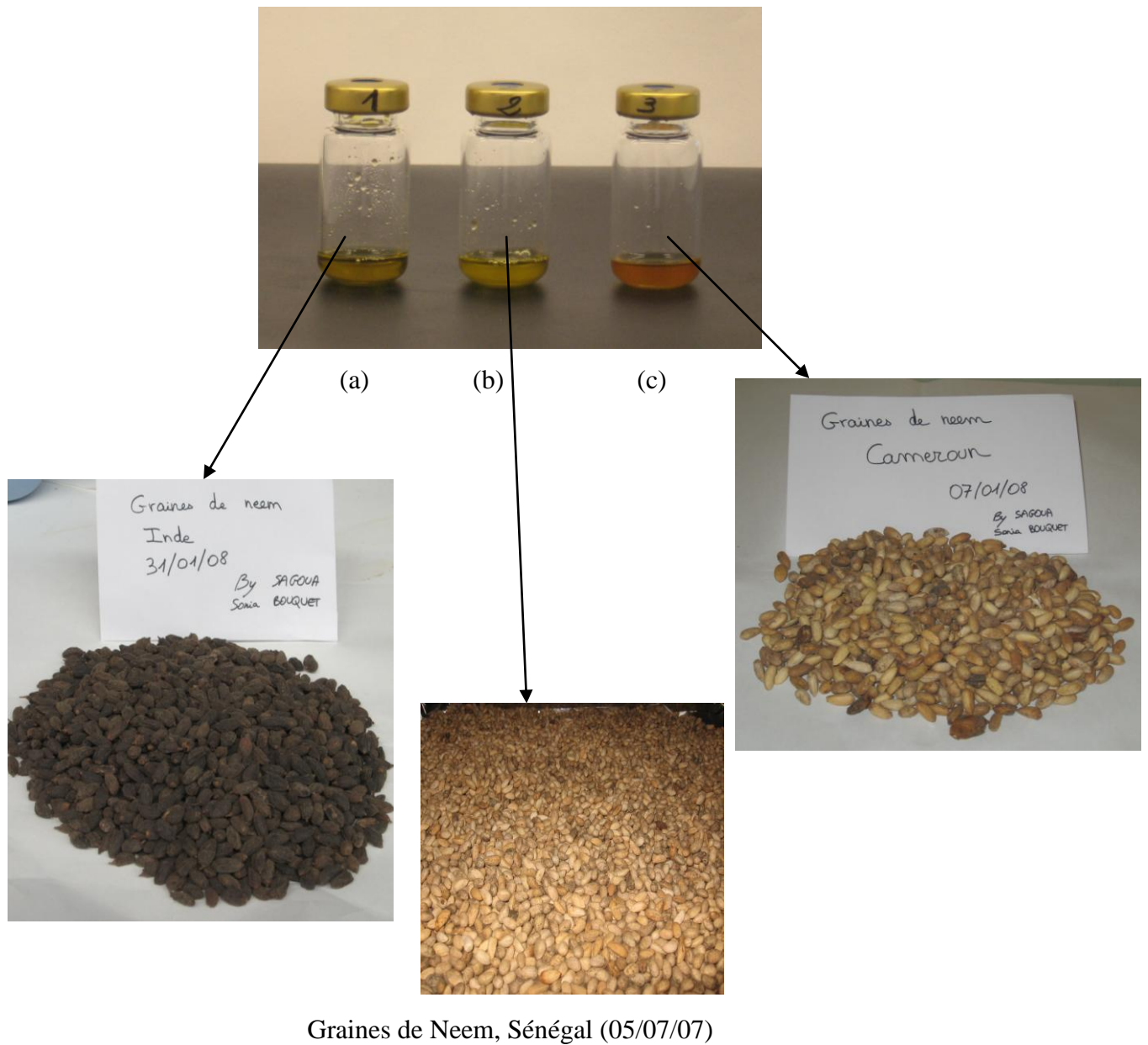


Figure 27 : Graines de Neem et huiles extraites :
(a) Cameroun (couleur verte, translucide) ; (b) Sénégal (couleur verte, trouble) et (c) Inde
(couleur marron/orangée)
(source : W. SAGOUA).

III. Caractérisation de l'huile de Neem et étude de son potentiel pour la lutte contre les souches fongiques causant l'anthraxose chez la banane

III. 1. Extraction des Huiles de Neem

III.1.1. Extraction par pression mécanique à froid

Les huiles extraites des graines de Neem du Sénégal, du Cameroun et d'Inde sont représentées dans la figure 27. La figure 28 nous renseigne sur le bilan matière de l'extraction d'huile de Neem par première pression mécanique à froid. Les rendements d'extraction en huile brute sont de 28% MS pour les graines du Sénégal, 18, 3% MS pour celles du Cameroun et de 8,9% MS pour celles originaires d'Inde (tableau XXI). Ces rendements sont faibles comparés aux données de Koul *et al.* (1990) qui déclarent que les graines de Neem contiennent de 40 à 43% d'huile. Nos faibles rendements s'expliquent par le procédé d'extraction par pression mécanique à froid, qui ne donne pas des rendements d'extraction très élevés, mais qui évite toute altération de l'huile

Le très faible rendement d'extraction des graines indiennes peut s'expliquer par le fait que ces graines (ou fruits) nous ont été fournies entières et sèches, non déulpées alors que celles du Sénégal et Cameroun étaient déulpées et séchées. Dans ces conditions, le rapport de la quantité d'huile rapportée à la masse de matière totale pressée est moindre.

Nous avons également extrait de l'huile de graines de Mélia (*Melia azedarach*) avec un rendement de 13,5%.

Nous avons quantifié l'huile contenue dans les tourteaux et les boues de filtration des graines du Sénégal par la méthode de Soxhlet (à l'hexane).

La teneur en huile extraite des tourteaux et des boues de filtration par Soxhlet était respectivement de 8% et de 46,5%. Nous avons également calculé l'huile résiduelle dans les tourteaux après l'extraction à froid, qui s'élève à 5% (tableau XXII). De même, la filtration des huiles conduit à une perte en huile qui s'élève à 17,4% (tableau XXIII) pour l'huile de Neem.

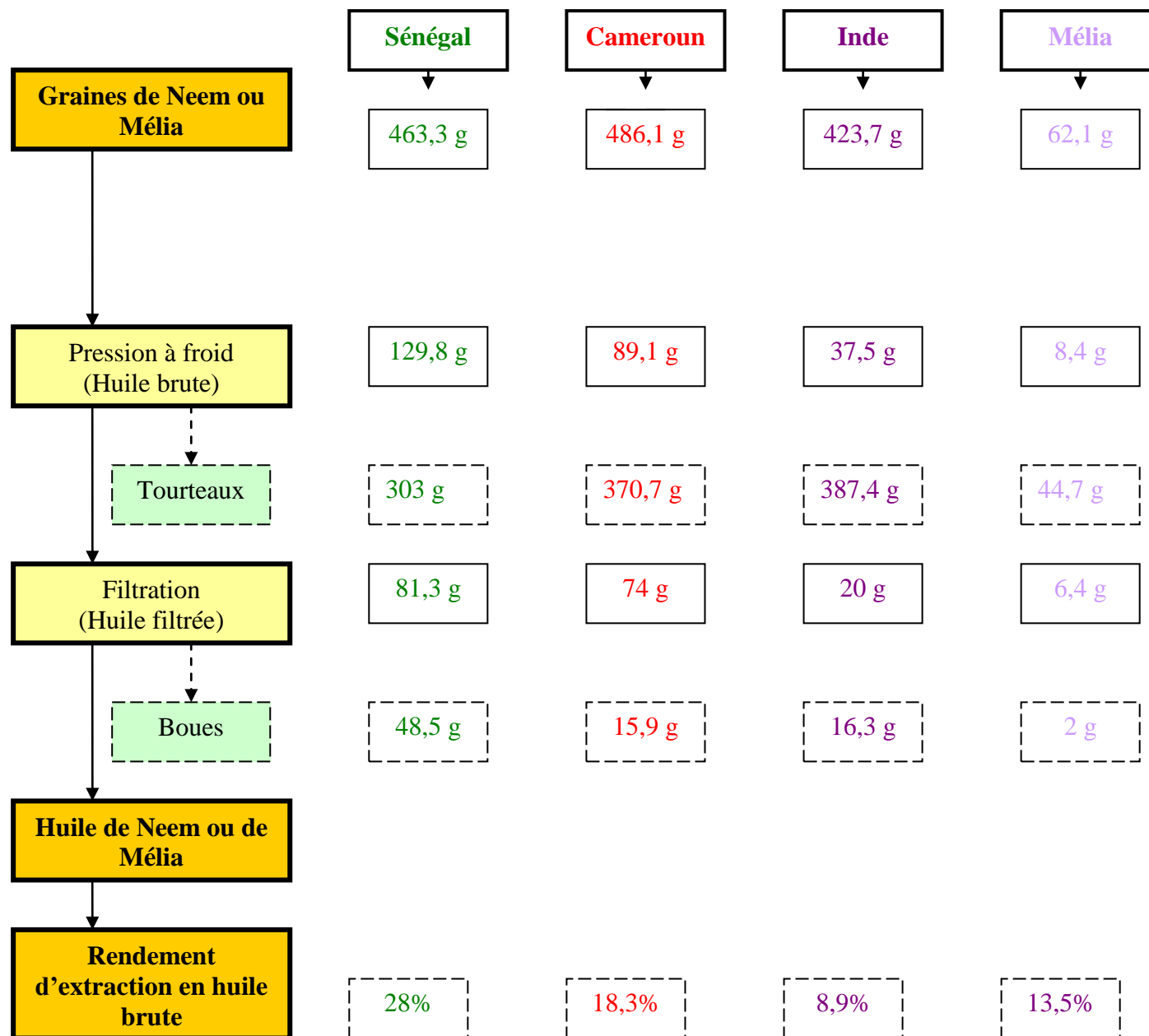


Figure 28 : Schéma et bilan matière de l'extraction par pression à froid d'huile de Neem du Sénégal, du Cameroun et d'Inde et de graines de Mèlia.

Tableau XXI : Quantité d'huile extraite dans les graines de Neem et de Méliá par première pression mécanique à froid.

	Neem	Méliá
Quantité de matière première analysée (g)	463,3	62,1
Quantité d'huile obtenue (g)	81,3	6,4
Teneur en huile dans les graines (%)	17,5	10,3

Tableau XXII: Calcul des pertes en huile dans les tourteaux, issus de la pression à froid.

	Neem	Méliá
Quantité totale de tourteau (g)	303,0	44,7
Quantité de tourteau analysé (g)	20,0	20,0
Quantité d'huile obtenue à partir du tourteau analysé (g)	1,6	6,2
Teneur en huile dans le tourteau (%)	7,9	31,1
Pourcentage de tourteau dans les graines (%)	65,4	72,0
Perte en huile lors de la pression à froid (%)	5,1	22,3

Tableau XXIII : Calcul des pertes en huile liées à la filtration de l'huile obtenue par pression à froid

	Neem	Méliá
Quantité de boues de filtration (g)	48,5	2,0
Quantité de boues analysées (g)	20,0	2,0
Quantité d'huile obtenue à partir des boues analysées (g)	9,3	0,1
Teneur en huile dans les boues de filtration (%)	46,6	5,0
Pourcentage de matière sèche dans l'huile extraite = pourcentage de boues (%)	37,4	23,8
Perte en huile lors de la filtration (%)	17,4	1,2

Tableau XXIV : Quantité d'huile des graines de Neem et de Méliá obtenue par extraction au Soxhlet.

	Neem	Méliá
Quantité de matière première sèche analysée (g)	20,0	20,0
Quantité d'huile obtenue (g)	6,4	7,7
Teneur en huile dans les graines (%)	31,7	38,7

III.1.2. Extraction par Soxhlet

L'extraction d'huile par la méthode de Soxhlet a été réalisée uniquement avec les graines de Neem du Sénégal et les graines de Méliá. Le but de cette extraction était de comparer le rendement des deux méthodes, pression mécanique à froid et Soxhlet, mais aussi d'évaluer l'influence de la méthode d'extraction sur la qualité des huiles, et en particulier la composition en volatiles et effet sur les espèces microbiennes.

Les graines de Neem ou de Méliá ont été broyées et séchées et 20 g de poudre de graines de Neem ou de Méliá ont été extraites au Soxhlet.

Cette méthode a permis un rendement d'extraction, en poids sec, de 31,7% contre 28% pour l'extraction par pression mécanique à froid pour l'huile de Neem et de 38,7% contre 13,5%

pour l'extraction par première pression mécanique à froid dans le cas de l'huile de Mélia (tableau XXIV). L'extraction au Soxhlet est considérée comme la méthode qui permet d'extraire la totalité des corps gras qui ne sont pas tous des huiles, aussi peut on considérer que l'extraction à froid permet d'extraire la presque totalité de l'huile des graines.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus dans la littérature où pour 42 échantillons d'huiles de Neem, Kumar et Parmar (1996) obtiennent après extraction par la méthode de Soxhlet un rendement en huile compris entre 18,5 et 52,5%.

III.2. Caractérisation des huiles de Neem

III.2.1. Détermination de la composition en acides gras des huiles de Neem par Chromatographie Phase Gazeuse (CPG)

La composition en acides gras des huiles extraites du Neem ou de Mélia a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode analytique demande dans un premier temps de former des esters méthyliques, d'acides gras, volatils qui sont ensuite séparés et caractérisés en CPG.

D'une manière générale, les profils des différentes huiles sont assez proches. En effet, les concentrations en acides palmitique, palmitoléique, margarique, linoléique, arachidique et gadoléique sont similaires d'une huile à une autre (tableau XXV). Par contre, concernant les acides myristique, stéarique, oléique et linoléique, on observe des différences. Selon leur composition en ces quatre acides, on peut identifier deux groupes : les huiles d'origine africaine, plus riches en acides stéarique et linoléique, et l'huile d'Inde qui se caractérise par des concentrations élevées en acides myristique et oléique.

Aussi nous pouvons dire que les deux huiles d'origine africaine sont proches concernant leur composition en acides gras, et différentes de celle venant d'Inde pour certains de ces acides.

Lorsqu'on considère les huiles par groupe (africaines et indienne), on constate que la composition de l'huile d'origine Indienne est très proche de la composition des huiles d'Inde trouvée dans la littérature. En ce qui concerne les huiles africaines, nous n'avons trouvé dans la littérature qu'une seule référence faisant mention de la composition en acides gras de l'huile de Neem du Bénin (Gossé *et al.*, 2005). Les concentrations obtenues dans notre étude sont similaires à celles citées pour de l'huile du Bénin (tableau XXVI).

On observe néanmoins une grande variabilité dans la composition en acides gras des huiles de Neem de la même origine (tableau XXVII), comme le montrent les résultats cités par Kumar et Parmar (1996), pour des huiles de Neem de 42 régions différentes de l'Inde.

Tableau XXV : Composition en acides gras des huiles de Neem
du Sénégal, du Cameroun et d'Inde

Acides gras (AG)	Sénégal (% total AG)	Cameroun (% total AG)	Inde (% total AG)
C14 :0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,03	0,32 ± 0,02
C16 :0	16,35 ± 0,16	18,09 ± 1,29	17,39 ± 0,2
C16 :1	0,1 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,03
C17 :0	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
C18 :0	17,32 ± 0,11	16,3 ± 0,52	15,96 ± 0,24
C18 :1	43,87 ± 0,07	44,23 ± 0,58	52,53 ± 0,09
C18 :2	20,33 ± 0,08	19,27 ± 0,42	11,4 ± 0,06
C18 :3 (n-3)	0,51 ± 0,02	0,56 ± 0,044	0,52 ± 0,01
C20 :0	1,26 ± 0,02	1,18 ± 0,17	1,53 ± 0,05
C20 :1	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,04
TOTAL	100	100	100

Tableau XXVI : Comparaison de la composition en acides gras d'huiles de Neem
du Sénégal, du Cameroun de notre étude et du Bénin selon Gossé *et al.* (2005)

Acides gras	Sénégal (%)	Cameroun (%)	Bénin (%) (Gossé <i>et al.</i> , 2005)
C14 :0	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,03	-
C16 :0	16,35 ± 0,16	18,09 ± 1,29	18,6
C16 :1	0,1 ± 0,03	0,11 ± 0,01	-
C17 :0	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,2
C18 :0	17,32 ± 0,11	16,3 ± 0,52	17,7
C18 :1	43,87 ± 0,07	44,23 ± 0,58	43,1
C18 :2	20,33 ± 0,08	19,27 ± 0,42	17,6
C18 :3 (n-3)	0,51 ± 0,02	0,56 ± 0,044	-
C20 :0	1,26 ± 0,02	1,18 ± 0,17	1,4
C20 :1	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,1

Tableau XXVII : Variabilité de la composition en acides gras des huiles
d'Inde citées dans la littérature

Acides gras	Nos résultats (%)	Srivastava et Prasad (2000) (%)	Kaushik (2002) (%)	Kumar et Parmar (1996) (%)
C14 :0	0,32	0,2-0,26	-	0,02-13,30
C16 :0	17,39	13,6-16,2	16,89-22,67	14,50-25
C16 :1	0,09	-	-	-
C17 :0	0,14	-	-	-
C18 :0	15,96	14,4-24,1	9,09-18,79	13,40-27,50
C18 :1	52,53	49,1-61,9	39,92-49,12	69-48,60
C18 :2	11,4	2,3-15,8	-	0,01-4,80
C18 :3 (n-3)	0,52	-	17,28-24,34	-
C20 :0	1,53	0,8-3,4	-	0,03-2
C20 :1	0,12	-	-	-

Tableau XXVIII : Composition en composés volatils de l'huile de Neem (*Azadirachta indica*) extraite au Soxhlet (1), par pression mécanique à froid (2) d'huile commerciale (3) et de l'huile de Mélia (*Melia azedarach*) extraite au Soxhlet (4) et par pression mécanique à froid (5).

Classe et composés	T _R ^a	Kovats RI	% Pic ^{b1}	% Pic ²	% Pic ³	% Pic ⁴	% Pic ⁵
Acides			(0,237)	(6,22)	(22,17)	(3,88)	(17,82)
Acide acétique	18,87	1415,4		3,44	7,6		1,60
Acide propanoïque	22,38	1501,9		0,91	6,84	1,67	0,31
Acide Butanoïque	26,10	1593,9			1,73		5,74
Acide Pentanoïque	30,19	1694,9			2,88	0,02	0,27
Acide Hexanoïque	33,83	1784,5	0,105	1,10	1,31	2,07	9,9
Acide Heptanoïque	37,70	1880,5			0,40		
Acide Octanoïque	40,91	1959,8		0,15	0,33		
Acide Nonanoïque	43,16	2015,3	0,132	0,62	0,41	0,12	1,21
Acide 3-Furancarboxylique	43,89	2033,2			0,67		
Alcools			(1,76)	(19,01)	(3,24)	(8,96)	(20,01)
Benzyl Alcool	34,59	1803,5	0,23			0,35	
Ethanol	3,39	916,4	0,83	1,18		0,33	0,44
2,4-Pentanediol, 2-méthyl	26,11	1594,2	0,40				
2-Pentanol,2- méthyl	6,85	1109,2	0,30				
Alcool isobutylique	5,38	1034,0		0,55			
1-Pentanol	11,45	1229,3		0,25		0,22	7,21
2,3-Butanédiol	22,66	1508,8		12,28	0,85		
1-Hexanol	15,64	1335,5			0,64		9,85
Phényléthyl alcool	35,78	1833,1		0,78			
1-Propanol	5,097	1017,2		1,79		8,06	0,26
1-Octen-3-ol-	19,51				0,33		
1-butanol,3- méthyl-	9,898	1189,4		2,18			2,51
Glycérol	45,23	2066,6			1,42		
Hydrocarbures			(67,47)	(12,23)	(9,74)	(60,98)	(12,01)
Alcane C ₆	1,83	604,7		1,38			
Hexane	1,88	6,23			1,89		2,35
Heptane	1,94			0,79	1,42		
n-Heptane	1,99	665,6		0,88			
Cyclohexane	2,05	687,7	3,33			0,89	
Octane	2,36	801,6		1,86			3,53
Décane	4,55	984,9	0,54		1,43	0,86	0,28
Dodécane	10,22	1197,9			1,59		0,28
Dodécane,2,6,10-triméthyl-	4,77	997,9	0,37				1,58
Furane,3 méthyl	2,94	876,7		0,57			
Furane,2 éthyl	3,61	929		0,20			
Furane,2 penthyl	10,72	1210,6		0,4	1,81		
Pentane,3,3-diméthyl -	1,83	606,2	3,73			3,82	
Nonane, méthyl -	3,85	943,4	0,31			0,32	
Undécane	5,2	1035	0,49			1,01	
n-Undécane	6,49	1099,5	0,68		0,44		
Alcane C ₁₁	5,49	1041,4	0,24				
Tridécane	14,19	1299,7	0,52		0,29		
Indane	15,60	1334,7	1,46			1,16	
Tetradécane	18,25	1399,8	0,47	0,43			0,64
Naphthalène	29,44	1676,4	0,47				
Ethyl Benzène	6,96	1111,9	0,45			0,49	
Benzène méthyl éthyl	8,45	1151,2	11,83			10,19	
Benzène ,1,2,3-triméthyl-	10,95	1216,7	18,82			22,06	
Benzène,1-méthyl-4-[1-	12,16	1247,6			0,42		

méthyléthyl]-							
Benzène,1-méthyl-2-(1-méthyléthyl)-	13,19	1241,1	1,53			0,88	1,24
Benzène,1-méthyl-4-propyl-	13,27	1276,2	7,64			3,27	
Benzène 1,2,4-triméthyl	14,39	1304,6		0,90	0,29		
Benzène,1-méthyl-2-propyl-	14,47	1306,6	0,68				
Benzène,-propyl-	9,67	1183,3	1,79			1,27	
Benzène,1,4-diéthyl-	13,51	1282,3	0,41			1,31	
Benzène,butyl-	13,62	1285,0	0,51			0,58	
Benzène,éthyl diméthyl-	14,11	1297,7	7,27			7,47	
Benzène,1-éthyl-,2,4-diméthyl	15,74	1338,1		0,34			
Benzène,1,2,3,4-tetraméthyl	17,91	1391,7	2,52			4,29	
Benzène 1,2,4,5-tetraméthyl	18,34	1402,2		0,21			
p-Xylène	8,76	1159,5	1,12	0,31	0,21	1,11	1,23
p-cymène	11,99	1243,5	0,29				
α-Pinène	4,93			0,67			
Copaène	21,101	1470,5		0,84	0,24		
Toluène	4,84	81013,8		0,43			0,88
Limonène	9,597	1181,3		0,27	0,46		
α-Bergamotène	24,75	1560,5		1,15			
Naphthalène	29,43	1676,3		1,27			
Cétones			(3,26)	(0,88)	(1,2)	(1,45)	(0,37)
Cyclohexanone	12,56	1257,9	2,38			1,45	
2-Butanone,3-hydroxy-	12,30	1251,3		0,64			
Octanone	12,799	1264,1		0,31			0,37
2-Nonanone	16,9	1366,7		0,54			
5-Hepten-2-one, 6-méthyl	14,6	1309,9		0,24	0,35		
2-Pyrrolidinone,1-méthyl	27,49	1627,5	0,88				
Aldéhyde				(15,53)	(3,57)	(0,37)	(3,58)
Propanal	2,26	764,2		0,91			
Butanal,2-méthyl	2,999	901,3		1,94			
Pentanal	3,972	950,8		2,93	0,30		
Hexanal	6,033	1072,6		3,18	0,76		1,11
2-Butenal,2-méthyl	6,25	1085		1,57			
Heptanal	9,05	1166,8		0,27			
Octanal	12,82	1264,6		0,77	0,60		
2-Heptenal	13,98	1294,5		0,55			0,77
Nonanal	16,96	1368,1		1,38	1,20	0,37	1,47
Benzaldéhyde	21,407	1478		1,62	0,40		0,23
Furfural	17,92	1391,5		0,41			
2-Octenal	18,32	1401,8			0,31		
Ester			(3,33)	(1,84)		(0,28)	(0)
Ethoxyethylacétate	2,879	868,9		1,03			
2-ethoxyethylacétate	13,01	1269,6	0,38			0,28	
Propanoic acid,3-ethoxy-,éthylester	14,55	1308,4	1,42				
acide	24,54	1555,4	0,32				
butanedioique,diméthylester							
Acide	28,55	1654,5	1,21				
pentanedioique,diméthylester							
n-Propylacétate	3,922	947,7		0,81			
Divers				(6,25)	(13,31)	(0)	(0)
H-Pyrrole,1-méthyl	7,428	1124,5		1,56			
1-Propène,1,1'-thiobis	10,39	1202,4		1,18			
Thiophène,diméthyl	11,238	1224		0,68			

Thiophène,2,5-diméthyl	8,27	1172,7		7,56
Thiazole diméthyl	13,756	1288	0,34	
Dipropyl, disulfide	16,22	1349,8	2,15	3,44
Quinoline	36,34	1846,8	0,34	
Pyrazine,2-éthyl-6-méthyl	16,67	1360,9		0,19
Pyrazine,2,3,5-triméthyl	17,45	1380		0,41
Pyrazine,2,3,5,6-tetraméthyl	20,32	1450,9		0,50
Pyrazine, 2,6-diméthyl	14,39	1304,6		0,82
1,8-Cinéole	10,06	1193,3		0,39

^a Temps de rétention

^b Les résultats ont été exprimé en pourcentage par rapport à l'aire totale

III.2.2. Analyse des composés volatils par SPME

Dans un premier temps, les huiles de Neem (origine Sénégal) extraites par la méthode du Soxhlet et par première pression mécanique à froid ont été analysées par SPME et comparées entre elles. Dans un second temps, nous avons aussi analysé par SPME et comparé la composition en volatils des huiles de Neem, toutes extraites par première pression mécanique à froid, provenant de trois zones géographiques différentes (Inde, Cameroun et Sénégal)

III.2.2.1. Comparaison d'huiles de Neem extraites par la méthode du Soxhlet et par première pression mécanique à froid

Le tableau XXVIII donne la composition en composés volatils des huiles extraites des graines de Neem du Sénégal, soit par la méthode de Soxhlet, soit par première pression mécanique à froid et la composition d'une huile commerciale d'Inde, extraite par pression mécanique à froid.

Respectivement 37, 53 et 38 composés ont pu être identifiés dans l'huile extraite au Soxhlet et par pression mécanique et dans l'huile commerciale. Les différences observées concernent le pourcentage élevé d'hydrocarbure (67%) dans l'huile extraite par Soxhlet, contre 12% dans l'huile extraite par première pression mécanique à froid. Ces hydrocarbures incluent des hydrocarbures aromatiques de la famille du benzène. Le composé le plus abondant est le 1, 2, 3-triméthyl benzène, avec 18,8% de l'aire totale des pics.

Pour expliciter cette différence, nous avons extrait au Soxhlet l'huile résiduelle des tourteaux résultants de l'extraction mécanique. Cette huile a ensuite été analysée par SPME. L'huile des tourteaux présente un pourcentage en hydrocarbure de 63%. Nous en avons déduit que les hydrocarbures n'étaient pas présents en grande proportion dans les huiles obtenues par pression mécanique, parce que ce procédé ne permettait pas de bien les extraire des tourteaux. L'huile extraite par première pression mécanique à froid, est caractérisée par la présence d'acides organiques (6%), d'alcools (19%), d'hydrocarbures (12%), d'aldéhydes (15,53%) et de divers composés incluant des terpènes et des composés organo-soufrés (6%). Parmi les composés organo-soufrés, nous avons identifié du dipropyl, disulfide ainsi que du 1-propène, 1, 1-thiobis. Le composé le plus abondant est le 2,3-butanediol avec 12% de l'aire totale des pics. Plus précisément, on peut préciser que :

- Les acides organiques de C₃ à C₉ sont majoritaires en pourcentage de l'aire total des pics. L'acide acétique est le plus abondant.

- Il existe une grande diversité des alcools de C₂ à C₉ parmi lesquels on trouve des alcools insaturés dont le plus abondant est le 2,3-butanediol (12% de l'aire totale des pics).
- Les aldéhydes sont des C₃ à C₉ parmi lesquels plusieurs aldéhydes insaturés. Les plus abondants sont le pentanal et l'hexanal.
- Les hydrocarbures représentent 12% de l'aire totale des pics. Et les composés divers représentent 6% de l'aire totale des pics. On y retrouve des composés organo-soufrés comme le 1-propène, 1,1'-thiobis et du dipropyl, disulfide.

Plus globalement, on peut dire que la composition en volatils de l'huile de Neem du Sénégal obtenue par première pression mécanique à froid est similaire à la composition en volatils des feuilles fraîches de Neem décrite par Zeringue et Bhatnagar (1994). La composition se rapproche de celle obtenue pour des extraits de feuilles de Neem et de fruits frais de Neem (Abyaneh *et al.*, 2005; Kurose et Yatagai, 2005; Balandrin *et al.*, 1988; Aromdee *et al.*, 2005). Cependant est ce qui concerne l'huile extraite par solvant, nous n'avons trouvé dans la littérature aucun élément de comparaison.

Tableau XXIX : Composition en volatils de l'huile de Neem (*Azadirachta indica*) de trois origines géographiques différentes (Inde, Sénégal et Cameroun).

Classe et composés	Famille	Tr	Neem Sénégal (%)	Neem Cameroun (%)	Neem Inde (%)
Acides					
Acide acétique	Acide	18,19	1,39	2,14	3,15
Acide butanedioïque	Acide				
Acide butanoïque	Acide	25,01			0,44
Acide méthyl butanoïque	Acide	26,58	0,17	0,67	2,19
Acide hexanedioïque	Acide				
Acide hexanoïque	Acide	32,83	0,21		4,75
Acide heptanoïque	Acide	36,48			0,25
Acide nonanique	Acide	43,27			0,66
Acide octanoïque	Acide	39,96			0,25
Acide pentanedioïque	Acide				
Acide pentanoïque	Acide	29,03			1,06
Acide méthyl pentanoïque	Acide	35,34			0,15
Acide propanoïque	Acide	21,65	0,39	0,42	
Hydrocarbures					
Pentyl furane	Alcane	9,9			0,97
Diméthyl furane	Alcane				0,17
Diéthyl trithiolane	Alcane	30,54	6,67	3,06	3,50
Nonane	Alcane	2,85			0,13
Nonane méthyl	Alcane				
Octane	Alcane	2,14			0,47
Undécane	Alcane	6,07			6,07
Méthylthio propène	Alcène	3,77		0,45	
Propène thiobis	Alcène	9,59		0,36	
Beta bisabolène	Alcène			1,38	0,98
Bicyclo diméthyl heptène (alpha bergamotène)	Alcène	23,64			2,91
Valencène	Alcène				0,41
Alcools					
Benzyl alcool	Alcool	33,58			0,35
Butanediol	Alcool	21,93	2,98	3,44	3,33
butanol méthyl	Alcool	9,23		1,06	
Ethanol	Alcool	3,1	0,26	0,37	
Hexanol	Alcool	15,02			0,65
Octenol	Alcool	18,75	0,12	0,39	0,35
Méthyl pentanol	Alcool	7,45		0,16	
Phenyléthyl alcool	Alcool	34,74		0,21	
Propanol	Alcool	4,64	0,27	0,31	

Ethanol epoxyethoxy	Alcool	24,78	0,16	0,45	
Méthyl propanol	Alcool	5,81		0,29	
Benzyl alcool	Cycloalcool	33,58			0,35
Aldéhydes					
Benzaldéhyde	Aldéhyde	20,60	0,18		1,13
Butanal méthyl	Aldéhyde	2,95	0,83		1,76
Furaldéhyde	Aldéhyde	17,32			0,14
Hepténal	Aldéhyde	13,17		0,35	
Hexanal	Aldéhyde	5,49	0,20	0,97	1,28
Nonanal	Aldéhyde	16,4	0,39	0,54	0,79
Octanal	Aldéhyde	11,98	0,14	0,25	0,57
Pentanal	Aldéhyde	3,66		0,44	0,19
Propanal	Aldéhyde	2,06	0,48		
Méthyl pentanal	Aldéhyde	4,04	0,27		
Méthyl butenal	Aldéhyde	5,73	12,10		0,42
Méthyl pentenal	Aldéhyde	7,53	24,95	8,84	3,88
Cétones					
Butanone	Cétone	2,75	0,06		
Ethanone (1H-pyrrolyl)	Cétone	36,58			1,44
Méthyl heptenone	Cétone	14			0,91
Octanone	Cétone	11,85			0,25
Nonanone	Cétone	16,26			0,41
Hydroxy butanone	Cétone	11,49	0,37		
Hydroxy pentanone	Cétone	14,74	0,42		
Diméthyl cyclopentanone	Cétone	18,17	0,63		
Méthyl propyl furanone	Cétone	21,3	1,18		
Butyrolactone	Cétone	24,34	0,18		
Méthyl furanone	Cétone	2,69	0,07		
Diméthyl furanone	Cétone	3,46	0,45		
Butanedione	Cétone	3,56	0,11		
Pantalactone	Cétone	38,43			0,59
Ethylidihydro furanone	Cétone	27,17			0,45
Diméthyl furanone	Cétone			0,16	
Butyrolactone	Hétérocycle oxygène	24,34	0,18	0,29	0,63
Esters					
Propenol acétate	Ester	2,17	0,30	0,72	
Ethylacétate	Ester	2,64	0,07		
n Propyl acétate	Ester	3,58		0,24	
Butanol méthyl acétate	Ester	6,56			0,39
Hétérocycles aromatiques					
diméthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	13,18	0,31	1,62	1,28
triméthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	16,72	0,74	0,72	0,39
Diméthyl éthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	18,31	0,52		1,35
Ethenyl éthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	19,76	0,18		
Triméthyl éthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	21,02	1,06	0,73	

Diméthyl propyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	20,94		1,04
Méthyl thiophène	Hétérocycle aromatique	6,28	0,23	0,26
Diméthyl thiophène	Hétérocycle aromatique	8,35	3,87	15,04
Tétraméthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique	19,44	0,95	0,33
Diéthyl méthyl pyrazine	Hétérocycle aromatique		0,73	
pyrrole méthyl	Hétérocycle aromatique	6,78	0,35	0,14
Thiophène diméthyl	Hétérocycle aromatique	10,4	5,23	
Diméthyl pyridine	Hétérocycle aromatique	13,55	1,24	
Triméthyl pyridine	Hétérocycle aromatique	19,5	1,40	
Ethyl diméthyl pyridine	Hétérocycle aromatique	27,81	0,31	
Ethyl méthyl thiazole	Hétérocycle e azoté	14,39	0,75	
Lactones				
Diméthyl hydroxy butanoic lactone	Lactone	32,86	3,76	
Terpènes				
Cedrene	Terpène	26,74	1,60	
Copaène	Sesquiterpène	24,42		0,57
D-limonène	Terpène		0,62	
Thiols				
Dipropyl, disulfide	Thiol	15,46	0,12	14,80
Méthyl trans propyl disulfide	Thiol			0,54
Propanethiol	Thiol		0,09	

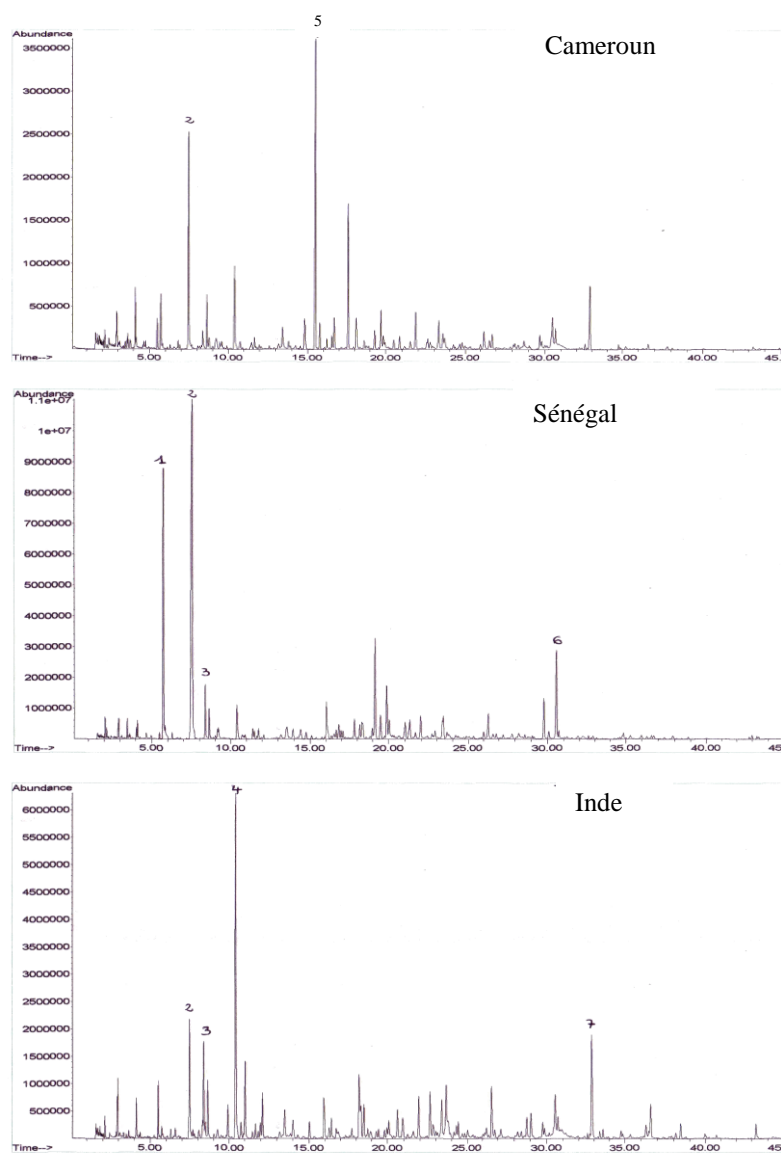


Figure 29 : Profils chromatographiques des composés volatils obtenus par GC-MS d'huiles de graines de Neem du Cameroun, du Sénégal et d'Inde.

III.2.2.2. Comparaison d'huiles de Neem extraites par première pression mécanique à froid provenance de 3 origines géographiques différentes (Inde, Sénégal et Cameroun)

Les huiles de Neem provenant de trois origines différentes Inde, Sénégal et Cameroun ont été obtenues par première pression mécanique à froid. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XXIX.

D'une manière générale, on observe que l'huile du Sénégal est plus riche en composés volatils. Les trois huiles présentent les mêmes familles de composés, mais en proportions différentes.

L'huile de Neem du Sénégal est très riche en aldéhyde (soit 39,5% de l'aire totale des pics). Les aldéhydes majoritaires sont le 2-méthyl-2-buténal (12%) et le 2-méthyl-2-penténal (25%) (respectivement les pics 1 et 2 de la figure 29).

L'huile du Cameroun est riche en aldéhydes (15%), en hétérocycles aromatiques (10%) et en thiols (15%). Les composés majoritaires sont le 2-méthyl-2-penténal (9%) et le dipropyl disulfide (15%).

Par contre, l'échantillon d'huile de Neem d'Inde est riche en acides (13%), en hydrocarbures simples (11%) et en hétérocycles aromatiques (20%). Le composé majoritaire est le diméthyl-2,5-thiophène (pic 4).

III.2.3. Composition en composé triterpéniques d'huiles de Neem du Sénégal, Cameroun et d'Inde

L'huile de Neem contient des triterpénoïdes comme l'azadirachtine, la nimbine, la salannin, la gédunine, composés qui ont des propriétés bioactives. L'azadirachtine est connue pour ses propriétés insecticides, alors que la nimbine et salannin sont connues pour avoir des propriétés antimicrobiennes. Aussi notre objectif était de déterminer si nos huiles contenaient de tels composés. Aussi la fraction insaponifiable extraite au méthanol et concentrée par évaporation a été analysée en LC-MS pour l'identification des triterpénoïdes. Les analyses ont été réalisées en ESI (négatif et positif) et en APCI (négatif et positif) à une longueur d'onde de 215 nm. Nous avons obtenu une meilleure détection en APCI. Les profils de la figure 30, représentent les profils chromatographiques obtenus en APCI.

Nous observons que pour les 3 origines d'huile, nous n'avons obtenu aucune détection en ESI négative. Tous les isomères d'azadirachtine ont été détectés en ESI positive. Dans le cas de l'APCI, des détections en positif et en négatif ont été obtenues. D'après Barrek *et al.* (2004) l'ESI positive est le mode d'ionisation le plus approprié pour l'analyse des extraits de Neem. Nous ne pouvons pas arriver à la même conclusion d'autant plus que dans le cas de l'APCI nous obtenons aussi de la détection et ce en négatif et en positif.

Les huiles du Cameroun et du Sénégal présentent des profils similaires et les mêmes pics, mais à différente proportion. Cinq isomères d'azadirachtine (I, H, D, A et B) ont été détectés et identifiés. Le plus abondant des isomères est l'azadirachtine A (pic 2). Les isomères I, H et D n'ont pas été détectés sur les chromatographes parce que les pics étaient très petits, montrant que leur concentration était très basse. Les pics 3, 6 et 9 sont respectivement l'azadirachtine B, la désacétyl nimbine et la salannine. Les pics 4 et 5 sont des triterpénoïdes que nous n'avons pas réussi à identifier et les pics 7, 8 et 10 ne sont pas des triterpénoïdes.

L'extraction des triterpénoïdes utilisée a été celle de Govindachari *et al.* (1998). Cependant pour les analyses en LC-MS nous avons utilisé sa méthode sans faire de gradient. Nous avons fait une analyse en isocratique avec un mélange MetOH/eau de 50/50 (v/v). Dans la littérature, plusieurs phases mobiles ont été utilisées pour extraire les triterpénoïdes de l'huile de Neem. En effet, Jonhson et Morgan (1997), Barrek *et al.*, ont utilisé de l'acétonitrile/eau à différents gradients pendant respectivement 50 min et 40 min, Schaff *et al.* (2000) un mélange acétonitrile/eau + 0,1 % d'acide trifluoroacétique avec un gradient.

Quelle que soit la phase mobile utilisée, notre finalité était d'obtenir le même ordre de sortie des triterpénoïdes, bien entendu à des temps de rétention différents.

Au départ, nous avons utilisé un mélange MetOH/eau de 60/40 (v/v) qui nous a permis d'identifier les pics, mais avec une mauvaise définition des bases de pics, ce qui nous a changer de proportion pour obtenir une base mieux définie. Les identifications ont été faites en nous basant sur la littérature qui nous donne les charges (m/z).

Nous n'avons pas cherché à quantifier les différents triterpénoïdes identifiés. En effet, notre objectif était de caractériser nos huiles avant de les utiliser pour nos tests microbiologiques et pouvoir expliquer et/ou interpréter de ce fait les résultats que nous pourrions avoir.

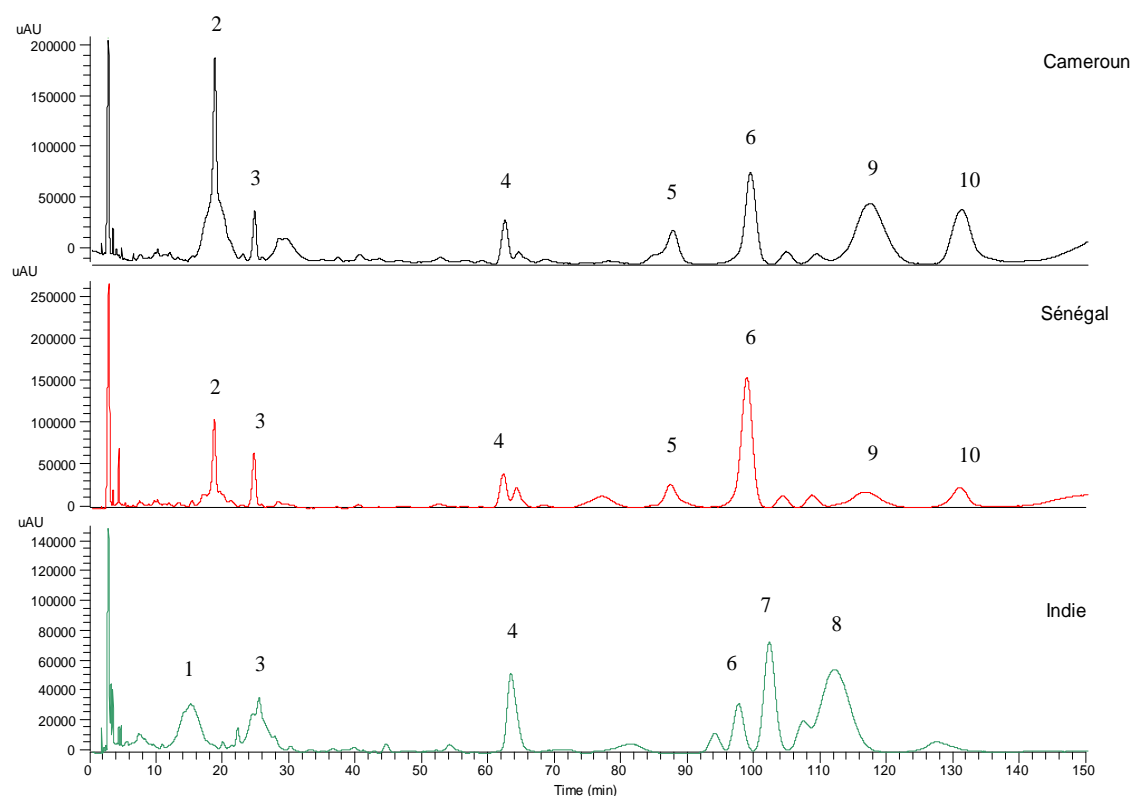


Figure 30 : Profils chromatographiques des différentes huiles de Neem obtenus à 215 nm.

III.3. Etude *in vitro* des propriétés antimicrobiennes de l'huile de Neem sur une collection de souches pathogènes de la banane

III.3.1. Effet des composés volatils de l'huile de Neem sur la croissance de souches fongiques pathogènes de la banane

III.3.1.1. Détermination de la dose de traitement

Pour déterminer la dose de traitement adéquate, nous avons utilisé de l'huile de Neem du commerce (origine Inde et obtenue par pression mécanique à froid). Pour ce faire, nous avons déposé des aliquots de respectivement 2, 4, 6, 10, 20, 40 et 100 μL sur une lame de laboratoire qui a ensuite été déposée dans le couvercle d'une boîte de Pétri contenant un disque de mycélium de 5 mm de diamètre. La croissance des champignons a été observée après 2 jours et 7 jours d'incubation à 30°C.

Après deux jours de croissance, il n'est pas possible de différencier la croissance des souches traitées des témoins sans traitement. Les résultats du tableau XXX sont ceux des observations réalisées après sept jours d'incubation.

Nous avons observé une grande variabilité dans le comportement des 17 souches étudiées, aussi, nous les avons regroupées en fonction de leur genre et espèce. Nous les avons regroupées en 6 groupes.

D'après ces résultats, la dose choisie pour la suite de l'étude est de 100 μL .

Tableau XXX : Pourcentage d'inhibition obtenu sur des souches pathogènes exposées aux vapeurs d'huile Neem

Code	2 µL	4 µL	6 µL	10 µL	20 µL	40 µL	100 µL
Co GLP 9	32,2±9,7	47,1±1,3	4,6±0,4	7,6±26,8	12,6±2,7	49,5±0,9	55,6±0,3
GI 310 B	50,9±4,3	50,9±6,8	53,6±0,4	40±8,2	10±2,9	54±3,6	60,4±5,7
Co GLP 18	45,4±1,1	-23,5±0	-16±6,6	-12,5±0	1,3±1,1	-13,6±5,1	37±17,5
GI 12.3 B	44,8±9,1	44,8±0	10,8±0	0±0	56,1±5	50,9±4,1	55,8±2,9
GI 5.1 B	31,9±3,8	54,1±1,1	2,8±0,7	12,1±0,5	45,3±9,1	55,4±1,7	52,8±1,1
Co CMR 64	40,5±0,4	10,8±16,7	23,3±0	38,9±4,1	0,8±0	39,8±0,9	43,4±1,9
Co CMR 55	0±0	0±0	10,6±0	2,1±0	0±0	0±0	0±0
ac 60 B	-3,1±4,4	-9,1±0	-2,5±2,6	13,7±7,9	27,5±8,7	29,1±9,2	43,7±3,3
mu 12.2 B	-1,2±10,6	29,1±2,6	29,5±7,9	6±7,4	9,3±7,4	28,3±1	29,6±2,1
mu 6.12 B	0±0	11,39±0	2,1±0	25,9±3,1	5,3±5,8	36,7±6,9	41,7±1,9
C 46.12	2,2±3,1	0±0	3,5±3,4	43,9±1,3	8,2±3,5	36,5±2,2	42,4±0
Co CMR 52	37,1±0,9	5,4±3,2	1,7±0,4	40±0,4	2,8±1,1	34,9±3,7	39±1,7
Co CMR 62	37,6±0,4	37,6±21	8,2±0,6	7,5±1,7	3,8±0	39,2±5,1	41,5±1,5
B 017	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B 027	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B 006	4,6±3,4	4,1±2,5	5,3±0,4	-2,7±2,	-0,6±1,4	0±0	3,2±2,9
Fusarium	50,2±0,5	50,2±6,9	40,9±4,5	44,4±8	35,8±14,5	19,9±0,5	59,5±3,2

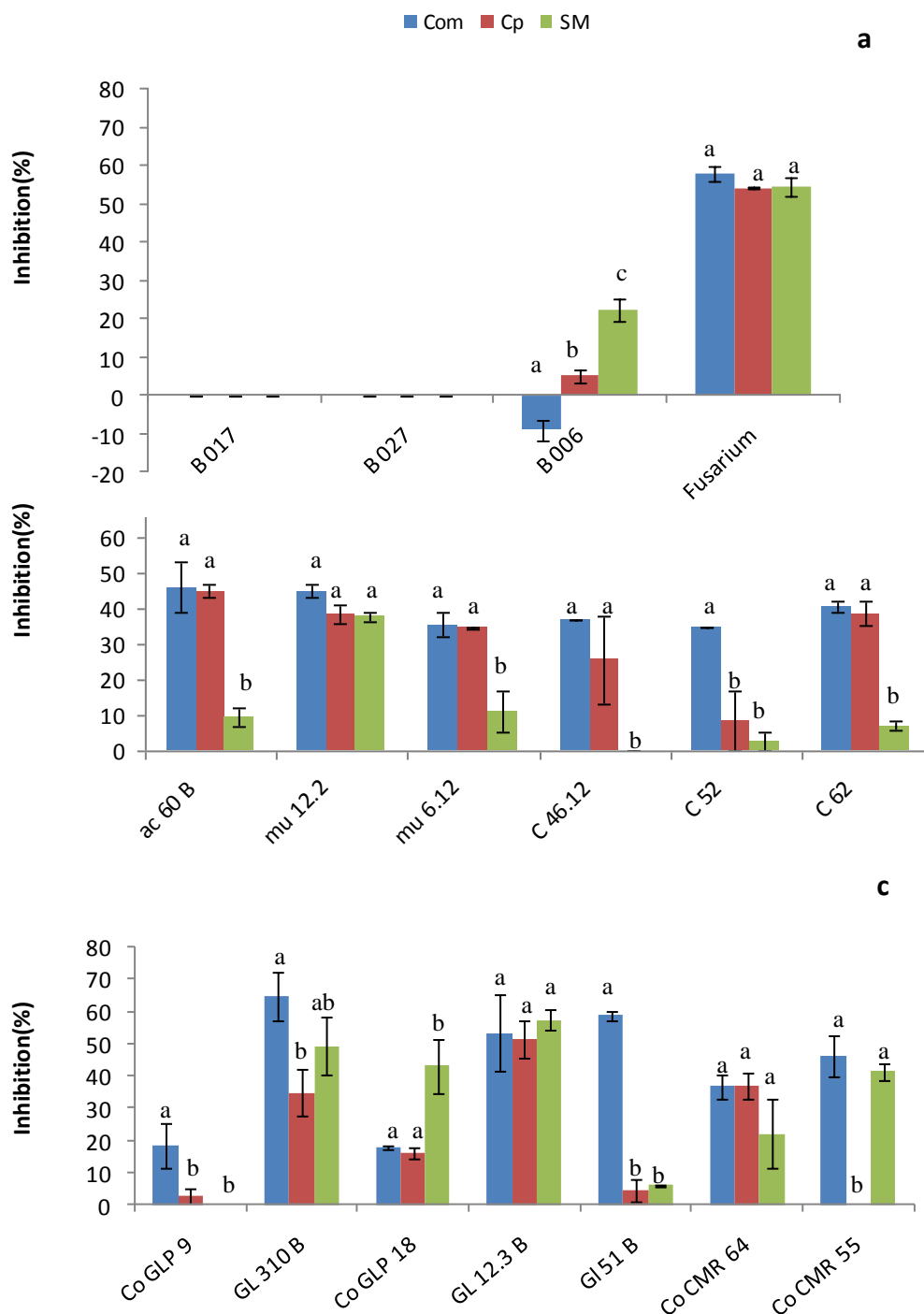


Figure 31 : Effet des volatils d’huile de Neem extraite par pression mécanique à froid (Cp) au Soxhlet (SM) et d’une huile commerciale (Com) sur la croissance de 17 souches fongiques pathogènes de banane cultivées à 30°C mesuré après 7 jours de culture.

III.3.1.2. Effet des volatils de l'huile de Neem extraite par la méthode de Soxhlet et par pression mécanique à froid sur la croissance de souches pathogènes de la banane

Pour cette étude, nous avons exposé 17 souches fongiques pathogènes précédentes aux vapeurs d'huiles de Neem (dose de 100 µL) commerciale (Com) qui a été obtenue par pression mécanique à froid de graines Neem d'Inde, extraite par pression à froid (CP) de graines de Neem du Sénégal et obtenue par extraction au Soxhlet de graines de Neem du Sénégal (SM).

Nous observons une inhibition significative des souches pathogènes exposées aux vapeurs d'huile de Neem quelle que soit l'huile et quelle que soit la souche fongique excepté pour le groupe des *Lasiodiplodia*. En effet, dans ce groupe seule la souche B 006 montre une inhibition très faible (5% pour la CP et 22,96% pour la SM) (figure 31). Pour les souches B 017 et B0 27 aucune inhibition n'est observée, mais on constate une différence qualitative au niveau des traitements et du témoin. Dans les boîtes traitées, le mycélium des *Lasiodiplodia* reste blanc alors que dans les boîtes témoins, il est noir. Cela signifie que dans les cultures traitées, il n'y a pas sporulation du champignon ou du moins la sporulation est altérée par le traitement car ce sont les spores qui donnent aux champignons leur couleur caractéristique.

L'inhibition la plus grande est obtenue pour les souches du groupe *Fusarium*, soit respectivement 58%, 54% et 54% pour la Com, la CP et la SM.

Le groupe des *Colletotrichum musae* présente également un pourcentage d'inhibition élevé en ce qui concerne les huiles Com et CP. L'huile SM présente des pourcentages plus bas pour ce groupe de l'ordre 0 à 11% sauf dans le cas de la souche mu 12.2B où le pourcentage d'inhibition pour cette huile est de 37,7%. Dans ce groupe, une différence significative est donc observée entre l'effet des huiles Com, CP et l'huile SM.

Les conclusions sont les mêmes pour le groupe des *Colletotrichum acutatum*. La seule espèce de ce groupe présente des inhibitions plus importantes dans le cas des huiles Com et CP, respectivement 46 et 45% contre 9,6% pour l'huile SM.

L'effet des huiles de Neem sur les groupes de *Colletotrichum gloeosporioides* et *Colletotrichum sp.* est plus divers. Cependant malgré cela, l'huile Com, présente les pourcentages d'inhibition les plus importants.

D'une manière générale, toutes les huiles présentent un effet inhibiteur significatif sur les différents pathogènes de la banane. Et nous avons l'intensité si après en matière d'effet :

Com > Cp > SM.

Il a été démontré par Zeringue et Bhatnagar (1994), que le 2,3-butanediol réduit la croissance mycéliaire d'*Aspergillus flavus*. De plus, les mêmes auteurs rapportent l'effet antimicrobien des aldéhydes monoinsaturés de C₆ à C₉ et des composés organosoufrés comme les diméthyl thiophène et les dipropyl, disulfide, toujours sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et sur sa production d'aflatoxine. Vu la composition de nos huiles en composés divers, nous pouvons aussi émettre l'hypothèse selon laquelle l'effet inhibiteur observé est dû aux interactions de plusieurs des composés volatils de huiles. En effet, l'huile SM est composée quasi exclusivement d'hydrocarbures et pourtant, un effet inhibiteur est observé pour cette huile également. De plus, l'huile Com est très riche en acides (en l'occurrence en acides acétique et propanoïque) et en diméthyl thiophène et elle présente pour quasiment toutes les souches l'effet inhibiteur le plus important.

III. 3.2 Etude *in vitro* des propriétés antimicrobiennes de l'huile de Neem incorporée du milieu de culture PDA sur une collection de souches fongiques pathogènes de la banane

III.3.2.1. Détermination de la dose de traitement

En nous basant sur les travaux de Mirza *et al.*, (2000) pour une pré-étude, nous avons testé trois concentrations d'huile de Neem 0,5, 1 et 2% (v/v) et nous avons utilisé une souche de *Colletotrichum sp.* Co CMR 64.

Et il existe une différence significative entre tous les traitements entre eux (figure 32). La dose qui donne l'inhibition la plus importante est celle de 2% (v/v) d'huile de Neem qui est la dose la plus élevée testée.

Pour la suite de notre étude, la dose de 2% (v/v) d'huile de Neem sera donc utilisée.

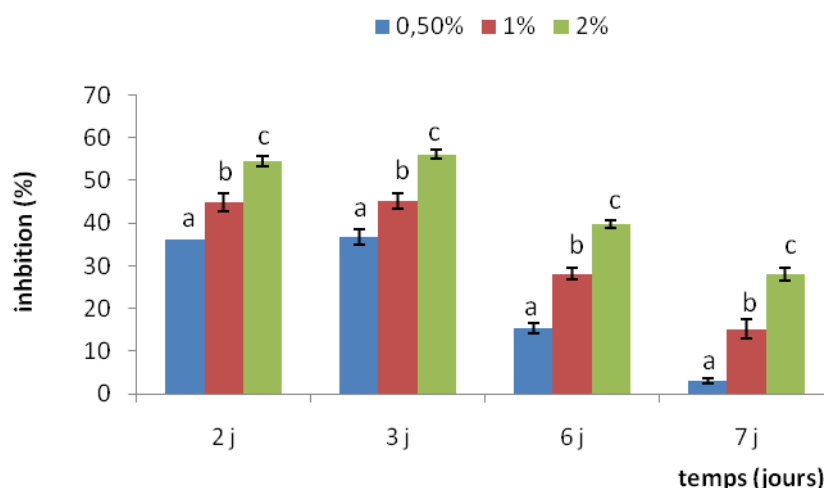


Figure 32 : Effet de l'huile de Neem après 2, 3, 6 et 7 jours à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 2%) dans du PDA sur la croissance de *Colletotrichum sp.*, cultivé à 30°C.

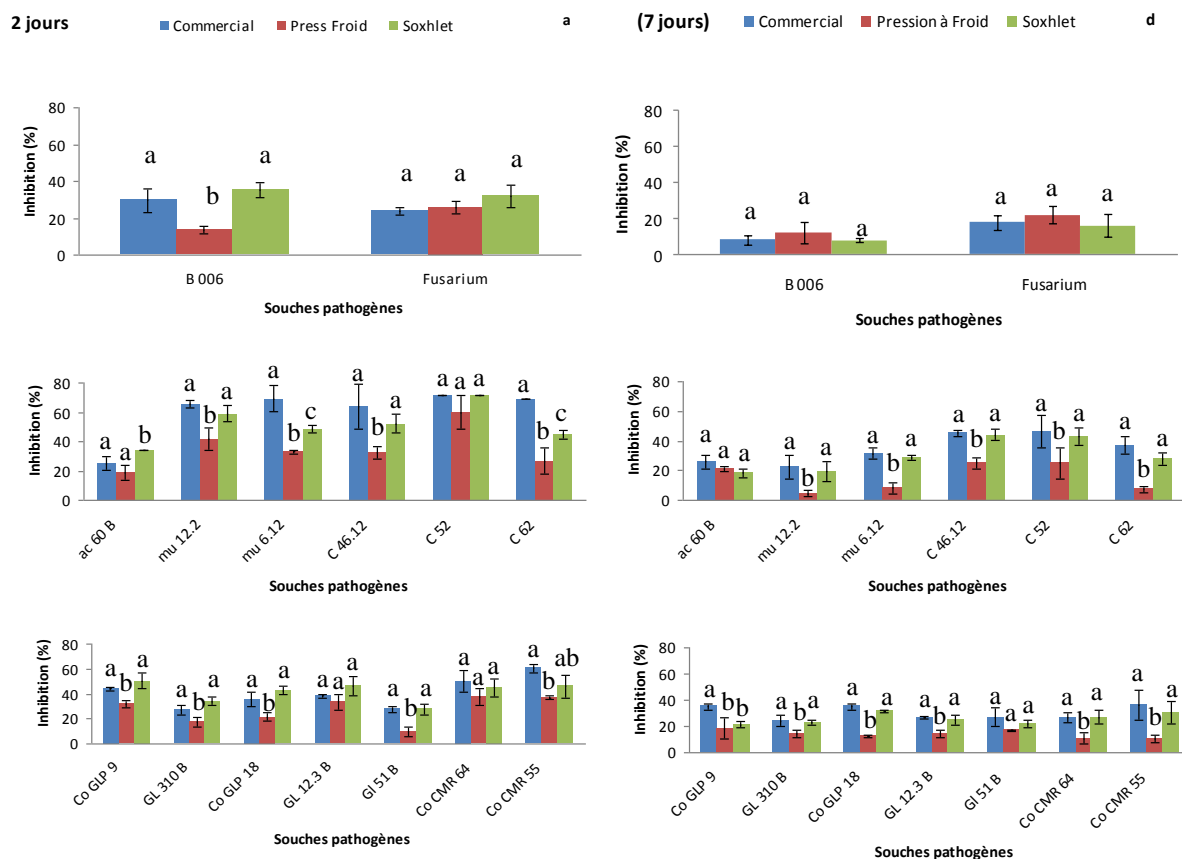


Figure 33 : Effet d'une concentration de 2% (v/v) d'huile de Neem dans du milieu PDA sur la croissance après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture de différentes souches fongiques pathogènes de la banane cultivées à 30°C après 1, 2, 3, 4 et 5 jours.

III.3.2.2. Incorporation d'huiles de Neem extraites par différentes méthodes (pression mécanique à froid et méthode de Soxhlet) dans du milieu de culture PDA

Deux pourcent d'huile de Neem obtenue selon différentes modalités (extraction au Soxhlet et par pression mécanique à froid), ont été introduites dans du milieu de culture PDA. Au centre des boîtes de Pétri ainsi coulées, un disque de mycélium de 5 mm de diamètre est introduit. Les résultats présentés dans la figure 33 montrent que les trois huiles de Neem testées inhibent la croissance de toutes les souches testées.

Pour les deux durées d'incubation les huiles commerciale et extraite au Soxhlet donnent les pourcentages d'inhibition les plus élevés.

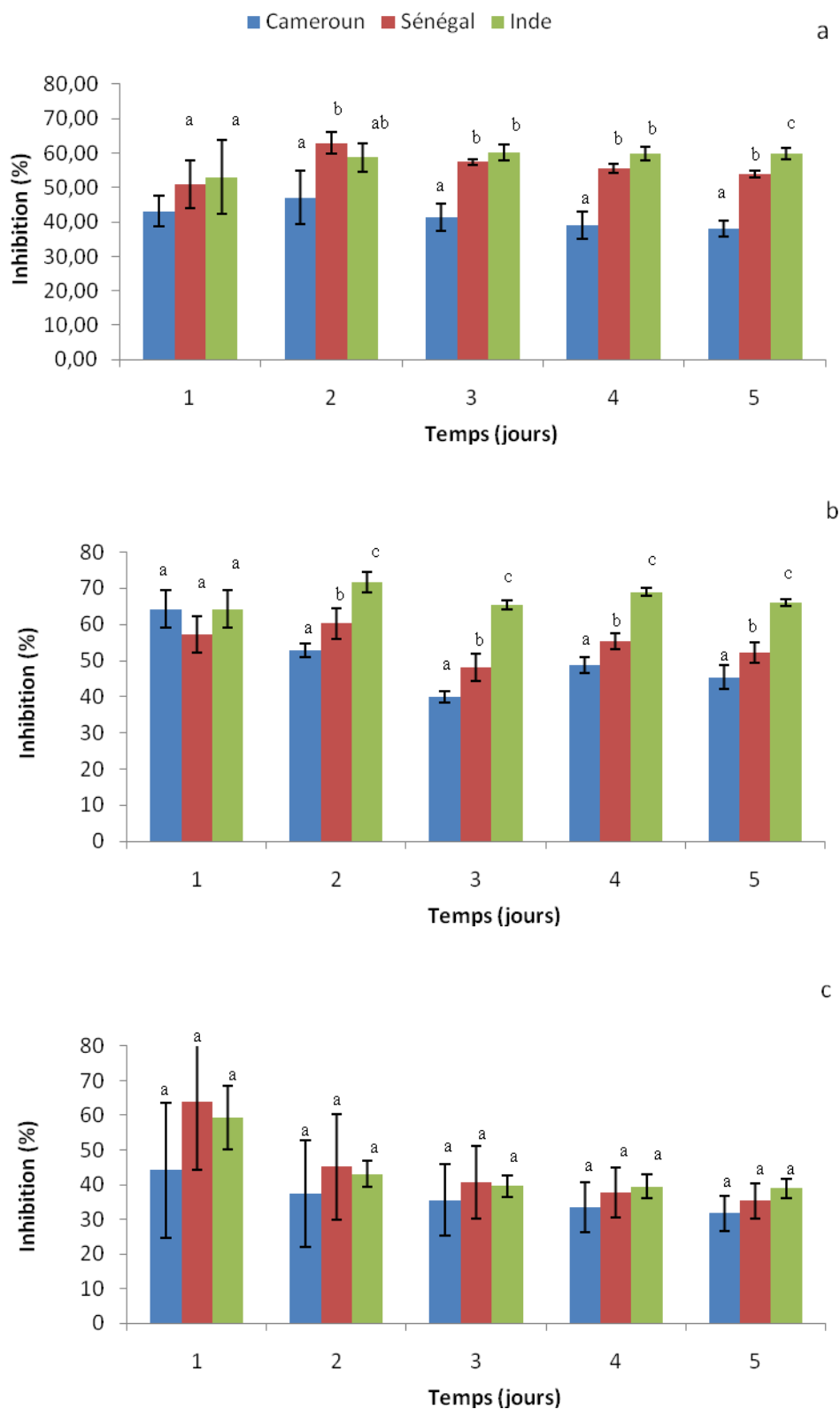


Figure 34 : Effet de différentes huiles de Neem à la concentration de 2 % (v/v) dans du milieu PDA sur la croissance de *Colletotrichum musae* (a), *Colletotrichum* sp. (b) et *Fusarium* sp. (c), cultivées à 30°C pendant 5 jours de croissance.

III.3.2.3. Etude des propriétés antifongiques d'huiles de graines de Neem d'Inde, du Cameroun et du Sénégal

Les huiles de Neem de trois différentes origines ont été incorporées à la concentration de 2% (v/v) dans le milieu de culture PDA. Trois souches fongiques pathogènes ont été testées : *Colletotrichum musae* (C 62), *Colletotrichum sp.* (Co CMR 55) et *Fusarium sp.* Les résultats sont présentés dans la figure 34.

On observe que les huiles de Neem, quelle que soit leur origine, inhibent significativement la croissance mycélienne des trois souches et ce quelque soit la durée d'incubation

Pour la souche de *Colletotrichum musae*, une différence significative a été observée pour les trois origines d'huile dès le deuxième jour (figure 34a) ; les huiles d'Inde et du Sénégal conduisent à des pourcentages d'inhibition très proches. Après 5 jours à 30°C, l'huile Indienne donne le pourcentage d'inhibition le plus élevé avec 60% suivie par l'huile Sénégalaise (54%) et l'huile du Cameroun (38%).

Nous faisons les mêmes observations pour la souche *Colletotrichum sp.*, avec une différence significative entre les effets des 3 huiles à partir du deuxième jour (figure 34b). Cependant, l'huile Indienne donne toujours le pourcentage d'inhibition le plus élevé (67%) et l'huile du Cameroun le moins élevé (50%).

Pour la souche de *Fusarium sp.*, une inhibition significative pour les trois traitements est observée. L'efficacité des trois huiles vis-à-vis de cette souche est semblable à celle observée pour les autres souches. L'huile indienne donne toujours les pourcentages d'inhibition les plus élevés (figure 30c), respectivement 44, 45 et 37% pour l'huile indienne, l'huile du Sénégal et l'huile du Cameroun.

Après 5 jours de culture, on transfère le disque de mycélium de 5 mm des boîtes de Pétri traitées dans un milieu de culture non traitement. On constate alors que la croissance mycélienne redémarre normalement. Cela nous permet de dire que l'huile de Neem a un effet fongistatique et non un effet fongicide. En effet, l'huile de Neem est plus connu pour ses effets insecticides et/ou insectifuge contre certains insectes post-récolte que contre les pathogènes post-récoltes (Lale et Abdulrahman, 1999 ; Makanjuola, 1989 ; Nathan *et al.*, 2006). Cependant, quelques études sur les effets antifongiques des produits du Neem ont été réalisées. Ainsi, Abyaneh *et al.* (2005) ont rapporté que les extraits de feuilles de Neem et de graines de Neem, incorporés dans du milieu de culture, à la concentration de 50% (v/v) ont réduit la production d'aflatoxine par *Aspergillus flavus* de respectivement 90 et 75%. Mirza *et al.* (2000) ont aussi observé une inhibition significative de la croissance mycélienne de

Phytophthora infestans causée par l'incorporation dans du milieu de culture de 1, 2 et 3% (v/v) d'huile de Neem.

Lorsque nous faisons un parallèle entre ces résultats microbiologiques et la caractérisation chimique des huiles, nous constatons que l'huile du Cameroun présente l'abondance la plus importante (en aire de pic) en azadirachtine A, et pourtant, c'est elle qui présente les pourcentages d'inhibition les plus bas et ce quelque soit la souche microbienne étudiée. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse selon laquelle l'azadirachtine ne possède pas d'effet antifongique (Govindachari *et al.*, 1998 ; Biswas, 2002). La désacétyl nimbine et la salannine présentent d'après Govindachari *et al.* (1998) des propriétés antifongiques. Néanmoins, les pics 4 et 5 qui sont des triterpénoïdes non identifiés peuvent aussi avoir des propriétés antifongiques, d'autant plus que l'huile d'Inde est riche en ce pic 4. De plus, l'effet antifongique des huiles peut être également dû à une combinaison entre les molécules actives comme les triterpénoïdes et les composés volatils ayant des propriétés antimicrobiennes également. En effet, les huiles de Neem étudiées contiennent aussi une fraction volatile qui comprend des composés connus comme ayant des propriétés antimicrobiennes à savoir, des aldéhydes monoinsaturés, le 2-méthyl-2-butenal et le 2-méthyl-2-pentenal pour l'huile du Sénégal, le diméthyl-2,5-thiophène pour l'huile d'Inde et le dipropyl-disulfide pour l'huile du Cameroun (Zeringue et Bhatnagar, 1994 ; Zeringue et McCormick, 1989 ; Khan *et al.*, 1974).

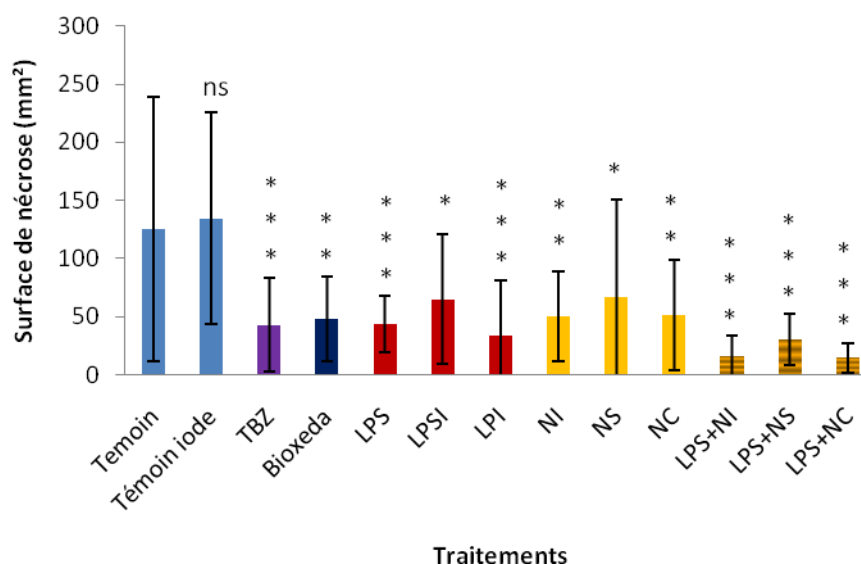


Figure 35 : Surfaces de nécrose (mm²) de bananes obtenues après de 10 jours de conservation à 20°C et 90% d'humidité après un traitement au TBZ, LPS, LPSI, LPI, LPS+Neem (Sénégal, Cameroun, Inde), huile de Neem (Sénégal, Cameroun, Inde) et Bioxeda[®].

NB : ns : non significatif

* significatif avec $p < 0,0$

** significatif avec $p < 0,005$

*** significatif avec $p < 0,0005$

IV. Etude de l'anthracnose de blessure

Les fruits utilisés nous ont été fournis par la compagnie Pronatura. Il s'agit de fruits issus de l'agriculture biologique qui proviennent de République Dominicaine.

Pour chaque traitement, 5 mains de 4 doigts chacun ont été utilisées et 2 fruits par mains ont été inoculés par une suspension de 10^6 conidies.mL⁻¹ de *Colletotrichum musae* C 62.

Deux lots sont des témoins : un lot inoculé trempé 1 min dans de l'eau et un lot inoculé trempé 1 min dans de l'eau contenant 49,8 mg.L⁻¹ d'iode (Témoin iode). Ce témoin a été réalisé pour les traitements LPI et LPSI.

Les résultats sont présentés dans la figure 35. Les analyses statistiques (test de Bonferroni avec un intervalle de confiance de 95%) n'ont montré aucune différence significative entre le témoin inoculé trempé dans l'eau et le témoin iode.

Globalement, nous observons un effet significatif pour tous les traitements. Plus précisément les traitements LPS, et LPS+huile de Neem (Sénégal, Cameroun et Inde) ainsi que les traitements LPI et TBZ présentent une différence hautement significative par rapport au témoin. Pour le TBZ, qui est un fongicide que l'on utilise habituellement pour les traitements post récolte des bananes, nous avons observé des lésions de nécrose. Cela signifie qu'il n'est pas totalement efficace contre le pathogène que nous avons inoculé aux bananes, en d'autres terme la souche inoculée (C 62) est résistante au TBZ. Les traitements aux huiles de Neem, quelque soit l'origine donnent des réductions moins importantes que dans le cas des traitements cités plus haut, notamment le traitement à l'huile de Neem du Sénégal qui donnait des résultats d'inhibition de croissance des pathogènes plus importants dans les études *in vitro*. Le même constat est fait pour le traitement au Bioxeda®. Notons que ces traitements ont été réalisés par pulvérisation manuelle.

Les traitements LPS+huile de Neem (Sénégal, Cameroun et Inde) ont permis une réduction de surface de nécrose des bananes traitées la plus importante. Nous pouvons supposer que ces résultats sont dûs à l'effet synergique du couplage des deux traitements LPS et huile de Neem. Cependant, cet effet synergique peut aussi être dû à l'oxydation des composés des huiles de Neem par la lactoperoxydase. Donc, création de nouveaux composés (non présents dans l'huile de Neem) qui ont un effet fongicides.

Pour tous les traitements, nous observons des écart-types très importants au niveau des résultats. La variation due aux répétitions est très importante. On peut chercher une ébauche de réponse dans la grande variabilité au sein des fruits eux-mêmes. Deux inoculations par

fruit ont été réalisées. De multiples inoculations par fruit auraient sans doute réduit l'impact du facteur répétition sur fruit et donc de se fait auraient aussi réduit les écart-types. La méthode d'inoculation a sans doute aussi eu une influence sur les résultats. En effet, les fruits sont inoculés puis laissés pendant 48 h à 25°C et 90% d'humidité relative afin de permettre le développement de l'appressorium, organe de pénétration du champignon dans la banane et ensuite des impacts sont réalisés pour simuler des blessures afin de déclencher la maladie.

Les résultats obtenus pour les test sur fruits sont différents des résultats de l'étude *in vitro* exception faites des résultats obtenus pour le traitement LPI. Néanmoins, l'utilisation de l'huile de Neem et/ou du couplage LPS+huile de Neem ou du LPI pourrait être une solution alternative intéressante pour limiter l'utilisation des pesticides chimiques

Conclusion et perspectives

Conclusion générale

Le présent travail a eu pour objectif la recherche de solutions alternatives à l'utilisation des pesticides chimiques de synthèse. L'alternative proposée a été le couplage du système lactoperoxydase avec d'autres substances naturelles ayant un potentiel antifongique.

Pour se faire, nous avons subdivisé les travaux réalisés en trois parties : tout d'abord l'optimisation du Système lacoperoxydase, l'étude d'autres substances ayant un potentiel antifongique et ensuite le couplage du système lactoperoxydase avec les substances naturelles sélectionnées.

Nous avons étudié trois substances naturelles, la lactoferrine, la formulation Bioxeda® et l'huile de Neem, ayant un potentiel effet antifongique pour la lutte contre l'anthracnose de la banane.

Dans une première partie, nous avons optimisé les concentrations des différents composés entrant dans la composition du système lactoperoxydase et testé l'efficacité de ce système ainsi optimisé sur la croissance de trois espèces fongiques pathogènes.

Ce système optimisé (ou initial) a été amélioré avec la substitution du thiocyanate par de l'iode ou l'addition d'iode au système initiale ou encore l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène (augmentation de la concentration de glucose). Les systèmes améliorés ont permis d'augmenter l'efficacité du système initiale ; l'ajout d'iode au système initial a entraîné un effet fongistatique tandis que la substitution du thiocyanate par l'iode a produit un effet fongicide.

Les objectifs de cette première partie ont été atteints, puisque nous avons pu augmenter l'efficacité du système lactoperoxydase avec les différentes combinaisons faites.

Dans la deuxième partie nous avons étudié l'effet antifongique de la lactoferrine et du Bioxeda®. Il en résulte que la lactoferrine n'aurait aucun effet sur la croissance des souches fongiques pathogènes étudiées. Elle a plutôt été une source nutritive pour ces souches.

Par contre le Bioxeda®, formulation commerciale riche en eugénol aurait un effet fongistatique, en moyenne 80% d'inhibition, sur les souches étudiées.

L'huile de Neem est très riche en composés volatils, tels l'acide acétique, les aldéhydes insaturés et des composés soufrés connus pour avoir des effets antimicrobiens.

De plus elle contient des composés triterpéniques tels que les azadirachtines (A, B, D, H, I), la nimbine, la déacetyl nimbine, la salannine.

Nous avons observé des différences dans la composition en composés volatils en fonction de la méthode d'extraction des huiles de Neem. En effet, l'huile extraite par Soxhlet présente une abondance en hydrocarbures (67%) et une composition moins équilibrée en acides, alcools, aldéhydes et composés soufrés que l'huile extraite par pression mécanique à froid.

La composition des huiles de Neem serait aussi influencée par la zone géographique. Ainsi l'huile du Sénégal serait plus riche en deux aldéhydes majoritaires ; le 2-méthyl-2buténal et le 2-méthyl-2-penténal, que celle du Cameroun.

Au niveau microbiologique, les huiles de Neem quelque soit leur origine géographique et leur mode d'extraction ont montré un potentiel antifongique.

Pour terminer, l'étude de l'antracnose de blessure de banane a permis d'étudier le couplage du LPS avec les différentes huiles de Neem extraites. Nous avons pu constater une inhibition des surfaces de nécroses sur les fruits traités avec tous les traitements.

Les différents travaux que nous avons réalisés ont été valorisés par la rédaction de deux publications soumises, une communication orale et un poster.

La première publication : Sagoua, W., Ducamp, M.N., Loiseau, G., de Lapeyre de Bellaire, L. **Effect of lactoperoxidase system on the control of *Colletotrichum musae* on bananas** a été soumise dans *Food Technology and Biotechnolgy*,

la seconde : Sagoua, W., Ducamp, M.N., Loiseau, G., Morel, G., Piombo, G., Coudret, A. **Investigation on Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil from Senegal, Cameroon and India for its potential use as an antifungal agent against banana fruit pathogens.** a été soumise dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

La communication orale a été faite au **4th International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits**, 3-7 Novembre 2008, Bogor, Indonésie. Communication orale : *In vitro* Antifungal Activity of Neem Oil against Banana Pathogens.

Le poster a été présenté au **11^e Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales**, 17-19 Avril 2009, Grasse, France. Poster : Etude *in vitro* de l'activité antifongique de l'huile de Neem sur les pathogènes de la banane.

Les autres résultats seront eux aussi présentés sous forme de publications.

Perspectives

Le présent travail mérite des études supplémentaires. Les perspectives que nous proposons pour la suite de ce travail sont d'ordre scientifique et technologique.

Perspectives Scientifiques :

- Quantifier les composés triterpéniques contenus dans les huiles de Neem des différentes origines,
- Tester les différents constituants des huiles de Neem pour déterminer lesquels ont des propriétés antifongiques,
- Comprendre le mode d'action de ces constituants antifongiques au niveau des structures cellulaires,
- Comprendre le mécanisme de résistance des souches pathogènes par rapport aux fongicides,
- Etudier la phytotoxicité et le transfert de l'huile de Neem dans les bananes traitées,
- Etudier la cytotoxicité du système lactoperoxydase-peroxyde d'hydrogène-iode (LPI) et de l'huile de Neem,
- Vérifier la stabilité chimique de l'huile de Neem,
- Etudier également les potentialités antifongiques des feuilles de Neem.
- Optimiser la méthode de traitement à l'huile de Neem,
- Comprendre le mécanisme d'action de l'huile de Neem sur les pathogènes.
- Continuer les tests sur fruits.

Perspectives Technologiques :

- Etudier la faisabilité des différents traitements dans les stations de conditionnement (coût, logistique)
- Etudier la possibilité d'incorporer le système lactoperoxydase et l'huile de Neem dans des enrobages
- Améliorer la méthode de pulvérisation

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Abang, M.M., Winter, S., Mignouna, H.D., Green, K.R., Asiedu, R. **2003**. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2, 486-496

Abyaneh, M.R., Allameh, A.; Al-Tiraihi, T.; Shams, **2005**. M. Studies on the mode of action of Neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed extracts on morphology and aflatoxin production ability of *Aspergillus parasiticus*. *Acta Horticulturae*, 675, 123-127.

Adolphe, Y., Jacquot, M., Linder, M., Revol-Junelles, A.M., Millièrre, J.B. **2006**. Optimization of components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1034-1042

Agrios, G.N. **1988**. *Plant Pathology*, 3rd Ed, Academic Press, London.

Andersson, Y., Lindquist, S., Lagerqvist, C., Hernell, O. **2000**. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk, *Early Human Development*, 59, 95-105

Anonyme, **1998**. Neem the Ultimate Herb, Nutraceutic.com. Inc, Gainesville, Florida, 39p

Aromdee, C.; Anorach, R.; Sriubolmas, N. **2005**. Essential oil of the flower of *Azadirachta indica* (*Meliaceae*). *Acta Horticulturae*, 679, 11-14.

Aune, T.M. et Thomas, E.L. **1977**. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalysed oxidation of thiocyanate ion. *European Journal of Biochemistry*, 80, 209-214

Bailey J.A. et Jeger M.J. **1992**. *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. London: CAB International. 388p.

Baker, E.N. **1994**. Structure and reactivity of transferrins. *Advances in inorganic chemistry*, 41, 389-463

Bakry, F., Careel, F., Caruana, M.L., Côte, F.X., Jenny, C., Tezenas du Montcel, H. **1997**. Les bananiers. In Charrier, A., Hamon, S., Jacquot, M., Nicolas, D. (eds). *L'amélioration des plantes tropicales*. Montpellier, CIRAD, ORSTOM, 109-139

Balandrin, M.F., Lee, S.M., Klocke, J.A. **1988**. Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the Neem tree. *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1048-1054.

Bardsley, W.G. **1985**. Steady-state kinetics of lactoperoxidase-catalyzed reaction. In Pruitt, K. M., Tenovuo, J. O. (eds.), *The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance*. New York: Marcel Dekker. 55–87

Barrek, S., Paisse, O. **2004**. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 753-763.

Barrera-Necha, L.L., Garduno-Pizana, C., Garcia-Barrera, L.J. **2009**. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal*, 8, 47-21

Baveye, E., Elaiss, E., Mazurier, J., Spik, G., Legrand, D. **1999**. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 37, 281-286.

Bhandri, P.R., et Mukerji, B. **1959**. The neem: Indian lilac (*Azadirachta indica*). *The Eastern Pharmacist*, 2, 21-24.

Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U. **2002**. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, 82, 1336-1345.

Björck, L. **1990**. Antimicrobial agents in milk-Future possibilities. In Proceedings of the IIXXX international dairy congress. Montreal, 8–12 October, Vol. 2. 1652–1667.

Björck, L. **1992**. Lactoperoxidase. In Fox, P. F. *Advanced dairy chemistry Proteins*. London: Elsevier. Vol. 1. 332–338

Björck, L. et Mullan, W.M.A. **1993**. Lactoperoxidase. In Determination of indigenous antimicrobials proteins of milk, Brussels: International Dairy Federation, 29–31.

Board, R.G. **1995**. Natural antimicrobials from animals. In Gould, G. W. (ed.), *New methods of food preservation*. London: Blackie Academic and Professional. 40–57.

Bohnenstengel, F.I., Wray, V., Witte, L., Srivastava, R.P., Proksch, P. **1999**. Insecticidal meliacarpins (*C-seco* limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 50, 977-982.

Bosch, E.H., van Doorne, H., de Vries, S. **2000**. The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 215-224

Boussouel, N., Mathieu, F., Revol-Junelles, A-M., Millière, J.B. **2000**. Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 169-175

Brown, G.E. **1975**. Factors affecting post harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in Citrus fruits. *Phytopathology*, 65, 404–409

Bullen, J.J., Armstrong, J.A. **1979**. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, 36, 781-91.

Champion, J. **1963**. Le bananier. Paris, Maisonneuve et Larose, 263 p

Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G., Palacios, S.M. **2003**. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2506-2511

- Carpinella, M.C., Ferreyra, D., Valladares, G.R., Defago, M.T., Palacios, S.M. **2002**. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 66, 1731-1736.
- Chattopadhyay, R.R., Sarkar, S.K., Ganguly, S., Banerjee, R.N. **1992**. Active effects of *Azadirachta indica* leaves on some biochemical constituents of blood in rats. *Science & Culture*, 58, 39-40
- Chau, K.F. et Alvarez, A.M. **1983**. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology*, 73, 1113-1116.
- Cheesman, E.E. **1948**. Classification of the bananas. *Kew Bulletin*, 3, 17-28
- Chillet, M. **2003**. Incidence des conditions de croissance du fruit du bananier (*Musa* spp AAA cv 'Grande Naine') sur sa sensibilité à l'anthracnose de blessure due à *Colletotrichum musae* (Berk. and Curt.) Arx. : Thèse de doctorat. Université Montpellier II. Montpellier. 190p
- Coates, L., Johnson, G.I., Cooke, A.W. **1993**. Postharvest disease control in mangoes using high humidity hot air and fungicide treatments. *Annals of Applied Biology*, 123, 441-448
- Couey, H.M., Alvarez, A.M., Nelson, M.G. **1984**. Comparaison of hot-Water spray and immersion treatments for control of postharvest decay of papaya. *Plant Disease*, 68, 436-437
- Dakshinmurthi, K. **1954**. The amino acids in the leaf of *Azadirachta indica* (Melia) *Current Science (Bangalore)*, 23, 125-126.
- Davidson, P.M. **1997**. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington, DC: ASM Press, 520–556.
- De Costa, D.M., Erabadupitiya, H.R.U.T. **2005**. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 31-39

de Lapeyre de Bellaire L. **1999**. Bio-écologie de *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, agent de l'anthracnose des bananes, dans les conditions tropicales humides de la Guadeloupe : Thèse de doctorat. Université Paris Sud. Orsay. 100p

de Lapeyre de Bellaire, L et Dubois, C. **1997**. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. *Plant Disease*, 81, 1378-1383.

de Lapeyre de Bellaire, L., Chillet, M., Chilin-Charles, Y. **2008**. Determination of banana fruit susceptibility to post harvest diseases: wound anthracnose, quiescent anthracnose and crown rot. *Fruits*, 63, 183-186

de los Santos García de Paredes, B. et Romero Muñoz, F. **2002**. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection*, 21, 11–15

de Nardo, E.A.B., Costa, A.S., Lourençao, A.L. **1997**. *Melia azedarach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 80, 92-94.

Denis, F. et Ramet, J.P. **1989**. Antibacterial activity of lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. *Journal of Food Protection*, 52, 706-711

de Wit, J.N., et van Hooydonk, A.C.M. **1996**. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50, 227-244

Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G., Mazurier, J. **2000**. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of mitogen-activated protein-kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line *Journal of Cellular Biochemistry*, 79, 583-593

Diarra, M.S., Petitclerc, D., Lacasse, P. **2002**. Effect of lactoferrin in combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science*. 85, 1141-1149

Dionysius, D.A., Grieve, P.A., Vos, A.C. **1992**. Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antibacterial activity using two methods for hydrogen peroxide generation. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 146-153

Dufour, M., Simmonds, R.S., Bremer, P.J. **2003**. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of 'natural' antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 249-258

Ekstrand, B. **1989**. Antimicrobial factors in milk-A review. *Food Biotechnology*, 3, 105–126

Elass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., Spik, G. **1995**. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochemical Journal*, 312, 839-845.

Ellison, R.T. **1994**. The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357, 71-90.

FAO. **1999**. Manual on the use of the LP-system in milk handling and preservation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Farr, V.C., Prosser, C.G., Clark, D.A., Tong, M., Cooper, C.V., Willix-Payne, D., Davis, S.R. **2002**. Lactoferrin concentration is increased in milk from cows milked once-daily. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 62, 225-236

Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H. E. **2004**. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

Frossart, P. **1969**. Action du thiabendazole et du Benlate sur l'antracnose des bananes et son champignon pathogène *Colletotrichum musae*. *Fruits*, 24, 365-379

Gauvin, M.J., Bélanger, A., Nébié, R., Boivin, G. **2003**. *Azadirachta indica* : l'azadirachtine est-elle le seul ingrédient actif. *Phytoprotection*, 84, 115-119

Gosse, B.; Amissa, A.A.; Adje, F.A.; Niamke, F.B. **2005**, Analysis of components of Neem (*Azadirachta indica*) oil by diverse chromatographic techniques. *Journal of liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2225-2233.

Goubran, F.H. et Holmes, R.J. **1993**. The development of alternative fungicides from essentials oils. Victoria, Australia. Institute for Horticultural Development, Knoxfield, Department of Agriculture.

Govindachari, T.R.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Banumathy, B.; Masilamani, S. **1998**, Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*, 26, 1-8.

Griffiths, M.W. **1986**. Use of milk enzymes as index of heat treatment. *Journal of Food Protection*, 49, 696–703

Groves, M. L. **1960**. The isolation of a *red protein* from milk. *Journal of the American Chemical Society*, 52, 3345-3350

Guthrie, W. G. **1992**. Microbiological protection for cosmetics: A novel approach. *Drug and Cosmetic Industry*, 150, 40–41.

Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., Valent, B. **1988**. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, 239, 288–290

Hanssen, F.S. **1924**. The bactericidal property of milk. *British Journal of Experimental Pathology*, 5, 271–280.

Hawksworth, D.L., Sutton, B.C., Ainsworth, G.C. **1983**. Ainsworth and bisby's dictionary of fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England

Hennart, P. F. **1991**. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin-a content in breastmilk- Influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 32-39.

Hostachy, B., Vegh, I., Leroux, P., Jacquemot, E., Foucher, S., Pigou, R. **1990**. Bananes de la Martinique. Incidence des problèmes fongiques sur la qualité. *Phytoma*, 420, 37-44

Huang, S.W., Satué-Gracia, M.T., Frankel, E.N., German, J.B. **1999**. Effect of lactoferrin on oxidative stability of corn oil emulsions and liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1356-1361.

Huang, R.C., Zhou, J.B., Suenaga, H., Takezaki, K., Tadera, K., Nakatani, M., **1995**. Insect antifeedant property of limonoids from Okinawan and Chinese *Melia azedarach* L. and from Chinese *Melia toosendan* (Meliaceae), *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 59, 1755-1757

Ihalin, R., Nuutila, J., Loimaranta, V., Lenander, M., Tenovuori, J., Lilius, E.M. **2003**. Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* to killing by peroxidase-iodine-hydrogen peroxide combination in buffer solution and human whole saliva. *Anaerobe*, 9, 23-30

Jacob, B.M., Antony, E.K., Sreekumar, B., Haridas, M. **2000**. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Life Sciences*, 66, 2433–2439.

Joas, J. et Malisart, S. **2001**. Incidence des conditions d'application sur l'efficacité des fongicides utilisés en post-récolte pour la banane. *Fruits*, 56, 383-394

Johanson, A. et Blasquez, B. **1992**. Fungi associated with banana crown-rot on fieldpacked fruit from the Windward Island and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz, and imazalil. *Crop Protection*, 11, 79-83

Johnson, S. et Morgan, E.D. **1997**, Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Journal of Chromatography A*, 761, 53-63.

Jones, G., Bailey, J.A., O'Connell, R.J. **1995**. Sensitive staining of fungal extracellular matrices using colloidal gold. *Mycological Research*, 99, 567-573

Julan, J. **2004**. Etude du système lactoperoxydase pour la conservation en frais de la banane de Guadeloupe : Thèse de Master of Science. ENSIA-SIARC. Montpellier. 78p

Kahn, M.W., Alam, M.M., Khan, A.M., Sarena, S.K. **1974**. Effect of water-soluble fraction of oil-cakes and bitter principles of neem on some fungi and nematodes. *Acta Botanica Indica*, 2, 120-126.

Kanapathipillai, V.S., Ahmad, R., Mahamad, M.I. **1987**. The effect of sterile filtrates of *Trichoderma spp* and *Penicillium spp* and 4 kGy irradiation on the spore germination of *Colletotrichum musae*. In Singh, K.G., Manalo, P.L., Sastrontoma, S.S., Chan, K.C., Lim, L.G., Ganapathi, A.N., Rahim, M.A.A., Durai, P.S.S., Doss, M.C. (eds), *Movements of pests and control strategies*, Kuala Lumpur, Malaysia, ASEAN Plant and Quarantine Centre and Training Institute, 283-292

Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. **2001**. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 1-7

Kataria, H.C. **1994**. Medicinal plant *Melia azedarach* used in leprosy control. *Oriental Journal of Chemistry*, 10, 178-180.

Kaushik, N. **2002**. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 1199-1204.

Kennedy, M., O'rourke, A.L., McLay, J., Simmonds, R. **2000**. Use of a ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 147-158

- Khalid, S.A., Farouk, A., Geary, T.G., Jensen, J.B. **1986**. Potential antimalarial candidates from African plants. An in vitro approach using Plasmodium falciparum. *Journal of Ethnopharmacology*, 15, 201-209.
- Khan, S.H., Aked, J., Magan, N. **2000**. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. *Plant Pathology*, 50, 601-608
- Khare, A.K., Srivastava, M.C., Sharma, M.K., Tewari, J.P. **1984**. Antifertility activity of neem oil in rabbits and rats. *Probe*, 23, 90-93.
- Khattak, S.G., Gilani, S.N., Ikram, M. **1985**. Anti-pyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 14:45-51.
- Kim, M., Kim, S.K., Park, B.N., Lee, K.H., Mim, G.H., Seoh, J.Y., Park, C.G., Hwang, E.S., Cha, C.Y., Kook, Y.H. **1999**. Antiviral effects of 28-dacetylscutellin on herpes simplex virus-I replication. *Antiviral Research*, 43, 103-112
- Korhonen, H. **1980**. A new method for preserving raw milk-The lactoperoxidase antibacterial system. *World Animal Review*, 35, 23-29.
- Koul, O., Isman, M.B., Ketkar, C.M. **1990**. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botany*, 68, 1-11
- Krantz, J., Schmutterer, H., Koch, W. **1978**. Diseases, Pests and Weeds in Tropical Crops, Chichester.
- Krauss, U. et Johanson, A. **2000**. Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands, *Crop Protection*, 19, 151 – 160
- Kumar, J. et Parmar, B.S. **1996**. Physicochemical and chemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2137-2143

Kurose, K. et Yatagai, M. **2005**, Components of essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss. *Azadirachta siamensis* Velton. and *Azadirachta excels* (Jack) Jacobs and their comparison. *Journal of Wood Science*, 51, 185-188.

Kussendrager, K.D. et van Hooijdonk, A.C.M. **2000**. Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, 19–25.

Lale, N.E.S. et Abdulrahman, H.T. **1999**, Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil obtained by different methods and neem power for the management of *Callosobrochus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, 35, 135-143.

Larson, R.O. **1987**. Development of Margosan-O, a pesticide from neem seed. In Proceedings of the 3rd International Neem Conference, Nairobi, Kenya, July 10, 1986, 243-250.

Lassoudière, A. **2007**. Le bananier et sa culture. Versailles. Ed. Quae, 383p

Lavie, D., Levy, E.C., Jain, M.K. **1971**. Limonoids of biogenetic interest from *Melia azadirachta*. *Tetrahedron*, 27, 3927-3939.

Le Nguyen, D.D. **2002**. Etude du système lactoperoxydase pour la conservation en frais de mangues : Thèse de Master of Science. ENSIA-SIARC. Montpellier. 72p

Le Nguyen, D.D., Ducamp, M.N., Dornier, M., Montet, D., Loiseau, G., **2005**. Effect of lactoperoxidase system against three major causal agents of disease on mangoes. *Journal of Food Protection*, 68, 1497–1500

Leitch, E.C. et Willcox, M.D. **1999**. Lactoferrin increases the susceptibility of *S.epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Current Eye Research*, 19, 12-19.

Leite, B. et Nicholson, R.L. **1992**. Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*, 16, 76–86

- Lenné, J. M. **1992**. *Colletotrichum* diseases of Legumes. In Bailey, J. A. et Jeger, M. J.(eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford: CAB International, 134-166.
- Linden G. **1994**. In Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole., D. Lorient. MASSON Paris Milan Barcelone, 114-116.
- Loiseau, G., Roy, L., Bohuon, P., Montet, D., Gauthier, J. **1998**. Etude d'une méthode permettant de différer l'utilisation du lait au Tchad: l'activation de la lactoperoxydase. Marchés urbains et développement laitier en Afrique subsaharienne. Actes de l'atelier, Montpellier, France, 9-10 Septembre.Cirad
- Louis, I. et Cooke, R.C. **1985**. Enzymes in the conidial matrix of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Mycosphaerella pinodes*. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 742-745
- Makanjuola, W.A. **1989**, Evaluation of extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) for the control of some stored product pests. *Journal of Stored Products Research*, 25, 231-237.
- Marks, N.E., Grandison, A.S., Lewis, M.J. **2001**. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurised milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 735–741.
- Marshall, V.M. et Reiter, B. **1980**. Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 120, 513–516.
- Mclay, J.C., Kennedy, M.J., O'rourke, A.L., Elliot, R.M. et Simmonds, R.S. **2002**. Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination of monolaurin. *International Journal of Food Microbiol*, 73, 1-9
- McRae, C.F. et Stevens, G.R. **1990**. Role of conidial matrix of *Colletotrichum orbiculare* in pathogenesis of *Xanthium spinosum*. *Mycological Research*, 94, 890-896.

- Medina, I., Tombo, I., Satué-Gracia, M. T., German, J. B., Frankel, E.N. **2002**. Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in Liposomes and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2392-2399
- Mercure, E.W., Kunoh, H., Nicholson, R.L. **1994a**. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45, 407-420
- Mercure, E.W., Leite, B., Nicholson, R.L. **1994b**. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45, 421-440.
- Mercure, E.W., Kunoh, H., Nicholson, R.L. **1995**. Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46, 121-135.
- Meredith, D.S. **1962**. Some fungi on decaying banana leaves in Jamaica. *Transactions of the British Mycological Society*, 45, 335-347
- Meredith, D.S. **1965**. Tip rot of banana fruit in Jamaica. *Transaction of the British Mycological Society*, 45, 335-347
- Mirza, J.I.; Hameed, S.; Ahmad, I.; Ayub, N.; Strang, R.H.C. **2000**, *In vitro* Antifungal activity of Neem products against *Phytophthora infestans*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3, 824-828.
- Mitra, C.R. et Misra, P.S. **1967**. Amino acids of processed seed meal proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 697-700
- Modi, S., Behere, D.V., Mitra, S. **1989**. Binding of thiocyanate to lactoperoxidase: proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance studies. *Biochemistry*, 28, 4689-4694.

- Moore, S.A., Anderson, B.F., Groom, C.R., Haridas, M., Baker, E.N. **1997**. Three dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 274, 222-236.
- Muirhead, I.F. et Deverall, B.J. **1981**. Evolution of 3, 4-dihydroxybenzaldehyde, dopamine and its oxidation products as inhibitors of *Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) Arx in green banana fruits. *Australian Journal of Botany*, 32, 375-382.
- Murdock, C.A, Matthews, K.R. **2002**. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 850-856.
- Murphy, M.E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. **2001**. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Journal of Veterinary. Medical. Science*. 63, 637-645.
- Naidu, A.S. **2000**. Lactoperoxidase. In Naidu, A.S. (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton FL.: CRC Press. 103–132
- Nathan, S.S.; Kalaivani, K.; Murugan, K. **2006**, Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leafhopper, *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 102-107.
- Nicholson, R.L. et Epstein, L. **1991**. Adhesion of fungi to the plant surface. Prerequisite for pathogenesis. In Cole, G. T. et Hoch, H. C. (eds.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York : Plenum Press.
- Nicholson, R.L. et Moraes, W.B.C. **1980**. Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology*, 70, 255–261
- Nicholson, R.L., Butler, L.G., Asquith, T.N. **1986**. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, 76, 1315-1318.

Niehaus, M.D., Gwaltney Jr., J.M., Hendley, J.O., Newman, M.J., Heymann, P.W., Rakes, G.R., Platts-Mills, T.A.E., Guerrant, R.L. **2000**. Lactoferrin and Eosinophilic cationic protein in nasal secretions of patients with experimental rhinovirus colds, natural colds, and presumed acute community-acquired bacterial sinusitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3100-3102.

Nielsen, .N.S., Petersen, A., Meyer, A.S., Timm-Heinrich, M., Jacobsen, C. **2004**. Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7690-7699.

Nishijima, K.A., Miura, C.K., Armstrong, J.W., Brown, S.A., Hu, B.K.S. **1992**. Effect of forced hot-air treatment of papaya fruit on fruit quality and incidence of postharvest disease. *Plant Disease*, 76, 723-727

Palhano, F.L., Vilches, T.B.T, Santos, R.B., Orlando, M.T.D., Ventura, J.A., Fernandes, P.M.B. **2004**. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 61–66

Panda, S. et Kar, A. **2000**. How safe is Neem extract with respect to thyroid function in male mice. *Pharmacological Research*, 41, 419-422

Pare, S. et Loeillet, D. **1999**. Cahier des charges et filière banane. In Système de production durable en fruits et légumes. *Fruitrop*, 62, 13-17

Paul, K.G. et Ohlsson, P.I. **1985**. The chemical structure of lactoperoxidase. In Pruitt, K. M. et Tenovuo, J. O. (eds.), *The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance*. New York: Marcel Dekker. 15–29.

Pierce, A, Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Spik, G. **1991**. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin, *European Journal of Biochemistry*, 196, 177-184

- Piombo, G., Barouh, N., Barea, B., Boulanger, R., Brat, P., Pina, M., Villeneuve, P. **2006**. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux Corps gras Lipides*, 13, 195-199.
- Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N., Vina, I. **2004**, Evaluation of the potential of commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 935-940.
- Popper, L. et Knorr, D. **1997**. Inhibition of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system. *Nahrung*, 41, 29–33.
- Porto, M.D.M., Grau, C.R., de Zoeten, G., A., Gaard, G. **1988**. Histopathology of *Colletotrichum trifolii* on Alfalfa. *Phytopathology*, 78, 345-349.
- Postmaster, A., Kuo, J., Sivasithampam, K., Turner, D.W. **1997**. Interaction between *Colletotrichum musae* and antagonist microorganisms on the surface of banana leaf discs. *Scientia Horticulturae*, 71, 113-125
- Prakash, A.O., Mishra, A., Metha, H., Mathur, R. **1991**. Effect of ethanolic extract of *Azadirachta indica* seeds on organs in female rats. *Fitoterapia*, 62, 99–105
- Pruitt, K.M. et Kamau, D.N. **1991**. The lactoperoxidase system of bovine and human milk. In Robinson, D. S. et Eskin, N. A. M. (eds.), *Oxidative enzymes in foods*. London: Elsevier *Applied Science*, 133–174.
- Pruitt, K.M., Kamau, D.N., Miller, K., Mansson-Rahemtulla, B., Rahemtulla, F. **1990**. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. *Analytical Biochemistry*, 191, 278–286.
- Pruitt, K.M., Tenovuo, J., Andrews, R.W., McKane, T. **1982**. Lactoperoxidase-catalysed oxidation products. *Biochemistry*, 21, 562-567.

Prusky, D. et Plumbly, R.A. **1992**. Quiescent Infections of *Colletotrichum* in Tropical and Subtropical Fruits. In Bailey, J. A., and Jeger, M. J., (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford : CAB. International, 289-307.

Prusky, D., Freeman, S., Dickman, M.B. **2000**. *Colletotrichum*: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction. St Paul USA : APS Press. 400p

Puri, H.S. **1993**. Therapeutic uses of neem. (unpublished)

Ramadoss, C.S., Uhlig, J., Carlson, D.M., Butler, L.G., Nicholson, R.L. **1985**. Composition of mucilaginous spore matrix of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of corn, sorghum, and other grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 728-732.

Regnier, T., du Plooy, W., Combrinck, S., Botha, B. **2008**. Fungicotoxicity of Lippia scaberrima essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology* 48, 254-258.

Reiter, B. **1985**. Lactoperoxidase system of bovine milk. In Pruitt, K. M. et Tenovuo, J. O. (eds.), *The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance*. New York: Marcel Dekker. 123–141.

Reiter, B. et Härnult, G. **1984**. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47, 724–732.

Reiter, B. et Perraudin, J.P. **1991**. Lactoperoxidase: biological function. In *Peroxydases in Chemistry and Biology*, Boca Raton: CRC Press. 143-180

Rippon, L.E. et Glennies-Holmes, M. **1973**. Postharvest dipping of bananas. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 84, 229–231

Rotem, J., Cohen, Y. et Bashi, E. **1978**. Host and environment influences on sporulation in vivo. *Annual Review of Phytopathology*, 16, 83-101.

Royle, D. et Butler, D.R. **1986**. Epidemiological significance of liquid water in crop canopies and its role in disease forecasting. In Ayres, P. G. et Boddy, L. (eds.), *Water, Fungi and Plants*. Cambridge : Cambridge University Press, 139 - 156.

Sanchez, L., Aranda, P., Perez, M.D., Calvo, M. **1988**. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 369, 1005-1008.

Saraf, A.P., Joglekar, V.K. **1993**. Study of effect of "Karnim" in patients of non insulin dependent diabetes mellitus.

Schaff, O.; Jarvis, A.P.; van der Esch, S.A.; Giagnacovo, G.; Oldham, N.J. **2000**. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 886, 89-97.

Seacheol, M. et Krochta, J.M. **2005**. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science*, 2, 87-94.

Seebach, D., Adam, G., Zibuck, R., Simon, W., Rouilly, M., Meyer, W.L., Hinton, J.F., Privett, T.A., Templeton, G.E. **1989**. Gloeosporone a macrolide fungal germination self inhibitor; total synthesis and activity. *Liebigs Annalen der Chemie*, 12, 1233–1240

Sela-Buurlage, M., Epstein, L., Rodriguez, R.J. **1991**. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 345-352.

Sénéchal, Y., Sanier, C., Gohet, E., Dauzac, J. **1987**. Different ways for the penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into the leaves of *Hevea brasiliensis*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie*, 305, 537-542.

Shakeel-ur-Rehman et Farkye, N.Y. **2003**. Lactoperoxidase. In Roginski, R. Fuquay J. W., Fox, P. F. (Eds.), *Encyclopedia of dairy science*. Amsterdam: Academic Press. 939–941.

Simmonds, N.W. **1962**. Tropical Science Series: The evolution of the bananas. London: Longmans.170p

Sinha, K.C., Riar, S.S., Tiwary, R.S., Dhawan, A.K., Bardhwan, J., Thomas, P., Kain, A.K., Jain, R.K. **1984**. Neem oil as a vaginal contraceptive. *Indian Journal of Medical Research*, 79, 131-136.

Sinniah D. and Baskaran, G. **1981**. Margosa oil poisoning as a cause of Reye's syndrome. *Lancet*, 1, 487-489.

Skellon, J.H., Thorburn, S., Spence, J., Chatterjee, S.N. **1962**. The fatty acids of neem oil and their reduction products. *Journal of Scientific Food Agriculture*, 13, 639-643.

Skipp, R. A., Beever, R. E., Sharrock, K. R., Rikkerink, E. H. A., Templeton, M. D., **1995**. Colletotrichum. In: Kohmoto, K., Singh, U. S. et Singh, R. P., (Eds.), *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis. Vol 2 Eukaryotes*. New York : Elsiever Science

Soukka, T., Tenovu, J., Lenander-Lumikari, M. **1992**. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 90, 223-228

Spalding, D.H. et Reeder, W.F. **1978**. Controlling market disease of mangoes with heated benomyl. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society*, 91, 186-187

Srivastava, A. et Prasad, R. **2000**, Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 111-133.

Steijns, J. M., et van Hooijdonk, A. C. M. **2000**. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, W.S11-S17.

Stover, R.H. **1972**. Bananas, plantain and abaca diseases. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute, 316 p

Stover, R.H. et Simmonds, N.W. **1987**. Bananas. Essex, Longman, third edition, 468 p

Swinburnes, T.R. **1976**. Stimulants of germination and appressorial formation by *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) in banana leachate. *Phytopathologische Zeitschrift*, 87, 74-90

Talwar, G.P., Pal, R., Singh, O., Garg, S., Taluja, V., Upadhyay, S.N., Gopalan, S., Jain, V., Kaur, J., Sehgal, S. **1995**. Safety of intrauterine administration of purified neem seed oil (Praneem Vilci) in women and effect of its co-administration with the heterospecies dimer birth control vaccine on antibody response to human chorionic gonadotropin. *Indian Journal of Medical Research*, 102, 66-70

TeBeest, D.O., Templeton, G.E., Smith, R.J. **1978**. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* on northern jointvetch. *Phytopathology*, 68, 1271-1275.

Tenovuo, J.O. **1985**. The peroxidase systems in human secretions. In Pruitt, K. M. et Tenovuo, J. O. (eds.), *The lactoperoxydase system: Chemistry and biological significance*. New York: Marcel Dekker. 101–122.

Tenovuo, J.O., Pruitt, K.M., Thomas, E.L. **1982**. Peroxidase antimicrobial system of human saliva: hypothiocyanite levels in resting and stimulated saliva. *Journal of Dental Research*, 61, 932-985

Thai Thi, H. et Ducamp, M.N. **2008**. Effects of different coatings on biochemical changes of 'cat Hoa loc' mangoes in storage. *Postharvest Biology and Technologie*, 48, 150-152.

Thanabal, V. et La Mar, G.N. **1989**. A nuclear overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 25, 5844-5849.

Thomas, E.L. **1985**. Products of lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate and halides. In Pruitt, K.M. et Tenovuo, J.O. (eds.), *The lactoperoxidase system, Chemistry and Biological Significance*, New York: Marcel Dekker Inc, 31-53

- Thomas, E.L. et Aune, T.M. **1978**. Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. *Infection and Immunity* 20, 456-463
- Thomas, E.L., Bates, K.P., Jefferson, M.M. **1980**. Hypothiocyanite ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva. *Journal of Dental Research*, 59, 1466-1472
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H. **2002**. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 109-112.
- Tripathi, R.D., Banerji, R., Sharma, M.L., Balasubrahmanyam, V.R., Nigam, S.K. **1985**. Toxicity of essential oil from a new strain of *Ocimum gratissimum* (Clocimum) against Betelvine pathogenic fungi. *Agricultural Biology and Chemistry*, 48, 2277-2282
- Van der Bruggen, P. et Maraite, H. **1987**. Histopathology of cassava anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. *Parasitica*, 43, 3-21.
- Van der Bruggen, P., Gregoire, D., Maraite, H. **1990**. Temperature-induced alterations in the expression of susceptibility of cassava to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. *Journal of Phytopathology*, 130, 46-58.
- Valladares, G.R., Ferreyra, D., Defago, M.T., Carpinella, M.C., Palacios, S.M. **1999**. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 70, 421-424.
- Valladares, G., Defago, M.T., Palacios, S.M., Carpinella, M.C. **1997**. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 90, 747-750.
- Vashi, I.G. et Patel, H.C. **1988**. Amino acids content and microbial activity of azadirachta indica A juss. *Journal of the Institution of Chemists (India)*, 60, 43-44.

Veneziano, A., Vacca, G., Arana, S., De Simone, F., Rastrelli, L. **2004**. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chemistry*, 87, 383–386

Vivekananthan, R., Vivekananthan, R., Ravi, M., Saravanakumar, D., Kumar, N., Prakasam, V., Samiyappan, R. **2004**. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection*, 23, 1061–1067

von Arx, J.A. **1981**. The genera of fungi sporulating pure culture. Braunschweig. 410p

Waller, J.M. **1988**. New developments in integrated disease management of tropical plantation crops. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. *Pests and Diseases*, 297–305

Waller, J.M. **1992**. *Colletotrichum* Diseases of Perennial and other Cash Crops. In Bailey, J. A., et Jeger, M. J., (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford: CAB. International, p. 167-185.

Wardlaw, C.W. **1961**. Banana diseases. Longman, London, 648 p

Win, N., Jitareerat, P., Kanlayanarat, S., Sangchote, S. **2007**. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 333-340

Wolfson, L.M. et Sumner, S.S. **1993**. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. *Journal of Food Protection*, 56, 887–892.

Young, D.H. et Kauss, H. **1984**. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Applied Environmental Microbiology*, 47, 616-619.

Zagulki, T., Lipinski, P., Zagulska, A., Broniek, S., Jarzabek, Z. **1989**. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo. *British Journal of Experimental Pathology*, 70, 697-704.

Références bibliographiques

Zeringue, H. J. et McCormick, S.P. **1989**, Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicon*, 28, 445-448.

Zeringue, H.J. et Bhatnagar, D. **1994**, Effects of Neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 3543-3547.

Sites internet:

www.dkimages.com/.../Melia-azadirachta-3.html

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Acte de la presentation orale au congrès, 4th International Symposium on Tropical and Subtropical fruits à Bogor, Indonésie, du 3 au 7 Novembre 2008

***IN VITRO* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEEM OIL AGAINST BANANA PATHOGENS**

Woeheoudama SAGOUA
CIRAD-PERSYST
UMR QUALISUD
TA B-95/16, Avenue Agropolis,
34398 Montpellier Cedex 5,
France

Marie-Noëlle DUCAMP
CIRAD-PERSYST
UMR QUALISUD
TA B-95/16, Avenue Agropolis,
34398 Montpellier Cedex 5,
France

Gérard LOISEAU
ENSIA/Sup-Agro
UMR QUALISUD
B.P.5085,
34033 Montpellier Cedex 1,
France.

Keywords: Neem oil, antifungal activity, SPME, GC-MS, postharvest

Abstract

Neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae), is a medicinal tree from India. Neem kernel oils obtained using a cold press and solvent extraction by the Soxhlet method were assessed for antifungal activity against 17 fungal strains isolated from banana fruit. These oils (used at different concentrations) significantly inhibited mycelial growth of 14 of the strains tested after 7 days exposure at 30 °C by virtue of volatile compounds released from 100 µL of the oil. Volatile compounds present in the oils were characterized by SPME and GC-MS. This showed the presence of biologically active volatile compounds, such as organosulfur compounds, in the neem oils tested. These compounds are known to have antimicrobial activity. The *in vitro* results suggest that employing neem kernel oil as a fumigant to control post-harvest pathogens is worthy of further investigation.

INTRODUCTION

Neem (*Azadirachta indica*) is a tropical and subtropical species indigenous to India and South East Asia (Kunfel, 1978). It is from the Meliaceae family. Today, the Neem tree is grown in many Asian countries and in tropical regions of the western hemisphere (Sidhu et al., 2003).

The Neem tree has been known for centuries in India. In the Ayurveda language, it is called the “tree pharmacy”. Indeed, various neem parts have been used by Indians in cooking and in

folk medicine to treat malaria and other afflictions (Nadkarni and Nadkarni, 1954; Dey and Mair, 1973).

The aim of this paper was to study the effect of the volatile components of the kernel oil on the growth of different postharvest pathogenic fungi.

MATERIALS AND METHODS

Neem kernels were collected by ISRA (Senegalian Institute of Agricultural Research) at Thiès, Senegal, and dried in an oven at 55 °C for 3 days before use.

The kernels were divided in half, one half being crushed into small pieces for oil extraction by the Soxhlet method. The other half was used for oil extraction by cold press.

Pathogens

17 different strains of *Colletotrichum* species and *Lasiodiplodia* were used (Table 1), isolated from symptomatic fruit, purified, and preserved by CIRAD. Isolates were maintained on potato dextrose agar (PDA) (Difco, France) at 30 °C for 7 days before use.

Gas Chromatographic System

An Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with an Agilent MSD 5973N mass spectrometer (MS) detector and a DB-Wax capillary column (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thick) was used. The temperature was programmed from 40 °C to 240 °C (3 °C/min until 160 °C and 10 °C/min until 240 °C). Helium was used as a carrier gas at 1 mL/min constant flow rate and a scan range of 40 to 250 Daltons with the MS was operated at 70 eV with ion source temperature of 230 °C.

Identification of components

Identification of components was carried out by reverse fitting with NIST standard spectra and from linear retention index values (Davies, 1990).

Antimicrobial activity

Culture technique. A 5 mm diameter agar plug containing mycelia and spores of the fungus (inoculum) was aseptically collected from the edge of each actively growing fungal colony for each species.

Exposure to volatiles. Inoculated plates were exposed to volatiles applied to Petri dish lids. Aliquots of test oil (2, 4, 10, 20, 40 or 100 µL) were placed on a cover slip (Regnier et al, 2008). Three replicates per treatment were done, with the controls consisting of water instead of test substances. The Petri dishes were sealed with Parafilm, inverted and incubated at 30 °C. The colony diameter of each pathogen was measured after 2 and 7 days and data were expressed as percentage inhibition of mycelial growth (Plaza et al., 2004).

Results were analysed by ANOVA using Minitab. Differences of $P \leq 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Volatiles components identification

We observed differences in the composition of the three oils. We noted a high proportion of hydrocarbons in the oil obtained by the Soxhlet method (67.47 %) (Table), but only about 8 % (table) in the oils obtained by cold press. These hydrocarbons included many aromatic hydrocarbons from the benzene family.

Organosulphur compounds, such as thiophene and disopropyl, were identified in the cold press oils but not in the solvent extraction oil. Only two acids (Hexanoic acid and nonanoic acid) were identified in the solvent extraction oil and esters of the acids.

The Tables 2, 3 and 4 showed the different oils and de family of components that we found on it.

Determination of the amount of treatment

To determinate the appropriate volume of oil to use in our system, commercial neem oil (from India, obtained by cold press) was used. Aliquots of test oil (2, 4, 6, 10, 20, 40, 100 µL) were put on the cover slip of the Petri dishes. Inhibition of fungal growth was noted at every dose (Table 5) and that the strains reacted differently to each volume of treatment.

A lot of variation was observed between the 17 strains. We thus grouped them by genus and species. We thus have 6 groups of strains.

There were significant effect of the different oil volume used for the treatment and the 6 groups of strains.

100 μ L shown the higher inhibition for all the groups except for *Lasioidiplodia* group in which there was none inhibition. In this group we nevertheless observed a qualitative difference between the control and the treatment. *Lasioidiplodia* color was black because of the spores' production. After treatment, we had the same growth but the mycelium remained white. In *Fusarium* group, growth inhibition was observed at all concentrations used.

Exposure to volatiles

There was significant effect of the different oils against the pathogenic strains (Fig.1).

Over all (for the all strains groups) the commercial oil (from India and cold press) gave the higher inhibition percent. For the *Fusarium* group, the three oils gave the same results.

According the groups, the oils obtained by cold press or by Soxhlet method gave better inhibition growth.

DISCUSSION

The composition of the oils obtained by cold press is similar to the composition of neem seed oil found in the literature (Zeringue et al., 2001). It is similar to the Neem flower essential oil, Neem leaves extract volatiles components and fresh seeds (Abyaneh et al., 2005; Zeringue and Bhatnagar, 1994; Kurose and Yatagai, 2005; Balandrin et al. 1988; Aromdee and al., 2005). We haven't any information about the composition of oil obtained by Soxhlet method. Organosulfur components (that have known antifungal properties) were found in the commercial oil in high level, were supposed that these components can explain the better inhibition growth of the fungi that we found with this oil compared to the others.

The difference between the commercial oil and the cold press oil can be found on the origin of the kernels. Indeed, the commercial oil (obtain by cold press) was from India, and our oil was from Senegal. Sidhu et al. (2003) reported variability in triterpenoids composition of neem among the different provenances of India.

CONCLUSION

The method of neem oil extraction had an influence on the composition of the oil.

Oil extracted by Soxhlet method contained more hydrocarbons compounds than the two oils obtained by cold press.

No organosulfur compounds were found in the oil obtain by Soxhlet method whereas the commercial oil and the cold press oil contained these compounds.

The fungal groups reacted differently to the treatment, but 100 µL of oils gave the higher inhibition percent on the growth of 14 fungi and for three types of oil.

In *Lasiodiplodia* group, no significant inhibition was observed but in the case of the oil treatment, the mycelium remained white whereas the control fungus was black.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank M. Lebrun for dedicated technical help and Guy Self for revising the English version of this text.

Literature Cited

- Abyaneh, M.R., Allameh, A., Al-Tiraihi, T., Shams, M., 2005. Studies on the mode of action of Neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed extracts on morphology and aflatoxin production ability of *Aspergillus parasiticus*. *Acta Hort* 675: 123-127
- Aromdee, C., Anorach, R., Sriubolmas, N., 2005. Essential oil of the flower of *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Acta Hort.* 679: 11-14
- Balandrin, M.F., Lee, S.M., Klocke, J.A., 1988. Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the Neem tree, *Azadirachta indica* (Meliaceae). *J.Agric.Food Chem.* 38: 1048-1054
- Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *J.Chromatogr.* 503:1-24
- Dey, K.L., Mair, W., 1973. The indigenous drugs of India, 2nd ed. ; Pama Primlane, *Chronica Botanica*: New Delhi, India: 186-1897
- Kunfel, G., 1978. Flowering trees in subtropical gardens; Dr. Junk.W: The Hague-Boston-London, p 258
- Kurose, K., Yatagai, M., 2005. Components of essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* Velton, and *Azadirachta excels* (Jack) Jacobs and their comparison. *Journal of Wood Science* 51(2): 185-188
- Nadkarni, K.M., Nadkarni, A.K., 1954. Indian material medica, 3rd ed.; popular Book Depot: Bombay, India. Vol 1: 776-784
- Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N., Vina, I., 2004. Evaluation of the potential of commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 935-940
- Regnier, T., du Plooy, W., Combrinck, S., Botha, B. 2008. Fungicotoxicity of *Lippia*

- scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology* 48: 254-258.
- Sidhu, O.P., Kumar, V., Behl, H.M. 2003. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with Respect to Azadirachtin Content. *J. Agric. Food Chem.* 51: 910-915
- Sidhu, O.P., Kumar, V., Behl, H.m. 2004. Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of Neem among different provenances of India. *Industrial Crops and Products* 19: 69-75
- Zeringue, H.J., Bhatnagar, D., 1994. Effects of Neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*: 3543-3547
- Zeringue, H.J., Shih, Jr.B. Y., Bhatnagar, D., 2001. Effects of clarified Neem oil on growth and aflatoxin B₁ formation in submerged and plate cultures of aflatoxigenic *Aspergillus spp.* *Phytoparasitica* 29(4): 361-366

Table 1. List of different fungi used in the study

Code	Genus	Species	host Plant	Variety	Organ	Continent	Origin	Area
Co GLP 9	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banana	grande naine	floral part	Antilles	Guadeloupe	Dingue
GI 310 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banana	nc	floral part	Antilles	Guadeloupe	nc
Co GLP 18	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banana	grande naine	floral part	Antilles	Guadeloupe	Dingue
GI 12.3 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banana	nc	floral part	Antilles	Guadeloupe	nc
GI 5.1 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	Banana	nundu	fruit	Antilles	Guadeloupe	nc
Co CMR 64	<i>Colletotrichum</i>	<i>sp</i>	Banana	nc	nc	Africa	Cameroun	Njombe
Co CMR 55	<i>Colletotrichum</i>	<i>sp</i>	Banana	hybrid	fruit	Africa	Cameroun	Njombe
ac 60 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>acutatum</i>	Banana	grande naine	floral part	Antilles	Guadeloupe	Dingue
mu 12.2 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banana	nc	floral part	Antilles	Guadeloupe	nc
mu 6.12 B	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banana	nc	floral part	Antilles	Guadeloupe	nc
C 46.12	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banana	nc	nc	Antilles	Guadeloupe	nc
Co CMR 52	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banana	nc	fruit	Africa	Cameroon	Njombe
Co CMR 62	<i>Colletotrichum</i>	<i>musae</i>	Banana	P. Abu Perak	fruit	Africa	Cameroon	Njombe
B 017	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	Coconut	nc	Nc	nc	nc	nc
B 027	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	Mango	nc	Nc	nc	nc	nc
B 006	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>sp</i>	cocoa	nc	Nc	nc	nc	nc
Fusarium	<i>Fusarium</i>	<i>sp</i>	nc	nc	Nc	nc	nc	nc

nc, Unknown

Table 2. Composition of the volatiles components of neem (*Azadirachta indica*) kernel oil (obtained by the Soxhlet method)

Class and compound	RT ^a	Kovats RI	% Peak ^b
Acids (0.237)			
Hexanoic acid	33.83	1784.5	0.105
Nonanoic acid	43.16	2015.3	0.132
Alcohols (1.76)			
Benzyl Alcohol	34.59	1803.5	0.23
Ethanol	3.39	916.4	0.83
2-methyl,2,4-Pentanediol	26.11	1594.2	0.40
2-Pentanol,2-methyl-	6.85	1109.2	0.30
Hydrocarbons (67.47)			
Cyclohexane	2.05	687.7	3.33
Decane	4.55	984.9	0.54
Dodecane,2,6,10-trimethyl-	4.77	997.9	0.37
Pentane,3,3-dimethyl-	1.83	606.2	3.73
Nonane,methyl-	3.85	943.4	0.31
Undecane	5.2	1035	0.49
n-Undecane	6.49	1099.5	0.68
Alkane C ₁₁	5.49	1041.4	0.24
Tridecane	14.19	1299.7	0.52
Indane	15.60	1334.7	1.46
Tetradecane	18.25	1399.8	0.47
Naphthalene	29.44	1676.4	0.47
Ethyl Benzene	6.96	1111.9	0.45
Benzene methylethyl	8.45	1151.2	11.83
Benzene ,1,2,3-trimethyl-	10.95	1216.7	18.82
Benzene,1-methyl-2-(1-methylethyl)-	13.19	1241.1	1.53
Benzene,1-methyl-4-propyl-	13.27	1276.2	7.64
Benzene,1-methyl-2-propyl-	14.47	1306.6	0.68
Benzene,-propyl-	9.67	1183.3	1.79
Benzene,1,4-diethyl-	13.51	1282.3	0.41
Benzene,butyl-	13.62	1285.0	0.51
Benzene,ethyl dimethyl-	14.11	1297.7	7.27
Benzen,1,2,3,4-tetramethyl	17.91	1391.7	2.52
p-Xylene	8.76	1159.5	1.12
p-cymene	11.99	1243.5	0.29

Ketones (3.26)			
Cyclohexanone	12.56	1257.9	2.38
2-Pyrrolidinone,1-methyl	27.49	1627.5	0.88
Ester (3.33)			
2-ethoxyethylacetate	13.01	1269.6	0.38
Propanoic acid,3-ethoxy-,ethylester	14.55	1308.4	1.42
Butanedioic acid,dimethylester	24.54	1555.4	0.32
Pentanedioic acid,dimethylester	28.55	1654.5	1.21

^a Retention time^b data are expressed as percentages of the total peak areaTable 3. Composition of the volatiles components of neem (*Azadirachta indica*) kernel oil (obtained by cold press)

Class and compound	RT ^a	Kovats RI	% Peak ^b
Acid (6.22)			
Acetic acid	18.87	1415.4	3.44
Propanoic acid	22.38	1501.9	0.91
Hexanoic acid	33.83	1784.5	1.10
Octanoic acid	40.91	1959.8	0.15
Nonanoic acid	43.16	2015.4	0.62
Alcohols (19.01)			
Isobutyl alcohol	5.38	1034.0	0.55
Ethanol	3.39	916.2	1.18
1-Pentanol	11.45	1229.3	0.25
2,3-Butendiol	22.66	1508.8	12.28
Phenylethyl alcohol	35.78	1833.1	0.78
1-Propanol	5.097	1017.2	1.79
1-butanol,3-methyl-	9.898	1189.4	2.18
Hydrocarbons (12.23)			
Alkane C ₆	1.83	604.7	1.38
Heptane	1.94		0.79
n-Heptane	1.99	665.6	0.88
Octane	2.36	801.6	1.86
Furan,3 methyl	2.94	876.7	0.57
Furan,2 ethyl	3.61	929	0.20
Furan,2 penthyl	10.72	1210.6	0.4
Tetradecane	18.22	1399.	0.43

Toluene	4.84	81013.8	0.43
Limonene	9.597	1181.3	0.27
α -Bergamotene	24.75	1560.5	1.15
Benzene 1,2,4-trimethyl	14.39	1304.6	0.90
Benzene,1-ethyl-,2,4-dimethyl	15.74	1338.1	0.34
Benzene 1,2,4,5-tetramethyl	18.34	1402.2	0.21
Copaene	21.101	1470.5	0.84
Naphthalene	29.43	1676.3	1.27
p-Xylene	7.59	1128.8	0.31
Ketones (0.88)			
2-Butanone,3-hydroxy-	12.30	1251.3	0.64
5-Hepten-2-one, 6-methyl	14.6	1309.9	0.24
Aldehyde (15.53)			
Propanal	2.26	764.2	0.91
Butanal,2-methyl	2.999	901.3	1.94
Pentanal	3.972	950.8	2.93
Hexanal	6.033	1072.6	3.18
2-Butenal,2-methyl	6.25	1085	1.57
Heptanal	9.05	1166.8	0.27
Octanal	12.82	1264.6	0.77
2-Heptenal	13.98	1294.5	0.55
Nonanal	16.96	1368.1	1.38
Benzaldehyde	21.407	1478	1.62
Furfural	17.92	1391.5	0.41
Ester (1.84)			
Ethoxyethylacetate	2.879	868.9	1.03
n-Propylacetate	3.922	947.7	0.81
Miscellaneous (6.25)			
H-Pyrrole,1-methyl	7.428	1124.5	1.56
1-Propene,1,1'-thiobis	10.39	1202.4	1.18
Thiophene,dimethyl	11.238	1224	0.68
Thiazole dimethyl	13.756	1288	0.34
Disulfide,dipropyl	16.22	1349.8	2.15
Quinoline	36.34	1846.8	0.34

^a Retention time^b data are expressed as percentages of the total peak area

Table 4. Composition of the volatiles components of commercial neem (*Azadirachta indica*) kernel oil (cold press)

Class and compound	RT ^a	Kovats RI	% Peak ^b
Acid (22.17)			
Acetic acid	19.03	1415.4	7.6
Butanoic acid	26.10	1593.9	1.73
Propanoic acid	22.51	1501.9	6.84
Pentanoic acid	30.19	1694.9	2.88
Hexanoic acid	34.04	1784.5	1.31
Heptanoic acid	37.70	1880.5	0.40
Octanoic acid	41.07	1959.8	0.33
Nonanoic acid	43.267	2015.4	0.41
3-Furancarboxylic acid	43.89	2033.2	0.67
Alcohols (3.24)			
1-Octen-3-ol-	19.51	1431	0.33
Glycerol	45.23	2066.6	1.42
2,3-Butanediol	22.90	1514.9	0.85
1-Hexanol	15.64	1335.5	0.64
Hydrocarbons (9.74)			
Hexane	1.88	6.23	1.89
Decane	4.61	984.9	1.43
n-Undecane	6.9	1099.5	0.44
Tridecane	14.07	1299.7	0.29
Furan,2-pentyl-	10.84	1210.6	1.81
α -Pinene	4.93	1007.1	0.67
p-Xylene	7.70	1159.5	0.21
D-Limonene	9.68	1183.6	0.46
Benzene 1,2,4-trimethyl	12.49	1304.6	0.29
Benzene,1-methyl-4-[1-methylethyl]-	12.16	1247.6	0.42
Copaene	25.61	1470.5	0.24
Dodecane	10.22	1197.9	1.59
Ketones (1.2)			
Octanone	12.799	1264.1	0.31
Hepten-2-one, 6 methyl	14.77	1309.9	0.35
2-Nonanone	16.9	1366.7	0.54
Aldehyde (3.57)			

Pentanal	4.10	950.8	0.30
Hexanal	6.14	1072.6	0.76
Octanal	12.94	1264.6	0.60
Nonanal	17.06	1368.1	1.20
2-Octenal	18.32	1401.8	0.31
Benzaldehyde	21.64	1478	0.40
Miscellaneous (13.31)			
Pyrazine, 2,6-dimethyl	14.39	1304.6	0.82
Thiophene,2,5-dimethyl	8.27	1172.7	7.56
Disulfide,dipropyl	16.34	1349.8	3.44
Pyrazine,2-ethyl-6-methyl	16.67	1360.9	0.19
Pyrazine,2,3,5-trimethyl	17.45	1380	0.41
Pyrazine,2,3,5,6-tetramethyl	20.32	1450.9	0.50
1,8-Cineole	10.06	1193.3	0.39

^a Retention time

^b data are expressed as percentages of the total peak area

Table 5. Inhibitory effect of vapourised neem oil on percent mycelia growth inhibition of different pathogenic strains

Code	2 μ L	4 μ L	6 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L	100 μ L
Co GLP 9	32.21 \pm 9.73	47.16 \pm 1.39	4.69 \pm 0.46	7.64 \pm 26.86	12.66 \pm 2.78	49.56 \pm 0.93	55.68 \pm 0.38
GI 310 B	50.92 \pm 4.37	50.92 \pm 6.80	53.66 \pm 0.49	40.05 \pm 8.25	10.07 \pm 2.91	54 \pm 3.63	60.41 \pm 5.76
Co GLP 18	45.45 \pm 1.13	-23.53 \pm 0	-16.04 \pm 6.68	-12.57 \pm 0	1.34 \pm 1.13	-13.64 \pm 5.10	37.03 \pm 17.58
GI 12.3 B	44.81 \pm 9.18	44.81 \pm 0	10.82 \pm 0	0 \pm 0	56.17 \pm 5.05	50.97 \pm 4.13	55.84 \pm 2.98
GI 5.1 B	31.99 \pm 3.85	54.15 \pm 1.10	2.85 \pm 0.78	12.18 \pm 0.55	45.34 \pm 9.11	55.44 \pm 1.79	52.85 \pm 1.19
Co CMR 64	40.57 \pm 0.45	10.81 \pm 16.77	23.31 \pm 0	38.98 \pm 4.17	0.85 \pm 0	39.83 \pm 0.97	43.43 \pm 1.91
Co CMR 55	0 \pm 0	0 \pm 0	10.61 \pm 0	2.16 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
ac 60 B	-3.13 \pm 4.42	-9.17 \pm 0	-2.50 \pm 2.65	13.75 \pm 7.95	27.50 \pm 8.75	29.17 \pm 9.21	43.75 \pm 3.31
mu 12.2 B	-1.26 \pm 10.66	29.15 \pm 2.66	29.52 \pm 7.99	6.03 \pm 7.46	9.30 \pm 7.46	2839 \pm 1.07	29.65 \pm 2.18
mu 6.12 B	0 \pm 0	11.39 \pm 0	2.11 \pm 0	25.95 \pm 3.13	5.38 \pm 5.82	36.71 \pm 6.96	41.77 \pm 1.90
C 46.12	2.22 \pm 3.13	0 \pm 0	3.59 \pm 3.49	43.99 \pm 1.34	8.23 \pm 3.58	36.50 \pm 2.22	42.41 \pm 0
Co CMR 52	37.15 \pm 0.92	5.40 \pm 3.21	1.73 \pm 0.46	40.06 \pm 0.46	2.81 \pm 1.12	34.99 \pm 3.74	39.09 \pm 1.71
Co CMR 62	37.66 \pm 0.45	37.66 \pm 21.03	8.23 \pm 0.63	7.59 \pm 1.79	3.80 \pm 0	39.24 \pm 5.18	41.56 \pm 1.59
B 017	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
B 027	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
B 006	4.63 \pm 3.44	4.17 \pm 2.50	5.32 \pm 0.40	-2.78 \pm 2.08	-0.69 \pm 1.47	0 \pm 0	3.24 \pm 2.95
Fusarium	50.27 \pm 0.57	50.27 \pm 6.91	40.97 \pm 4.57	44.47 \pm 8	35.85 \pm 14.59	19.95 \pm 057	59.57 \pm 3.23

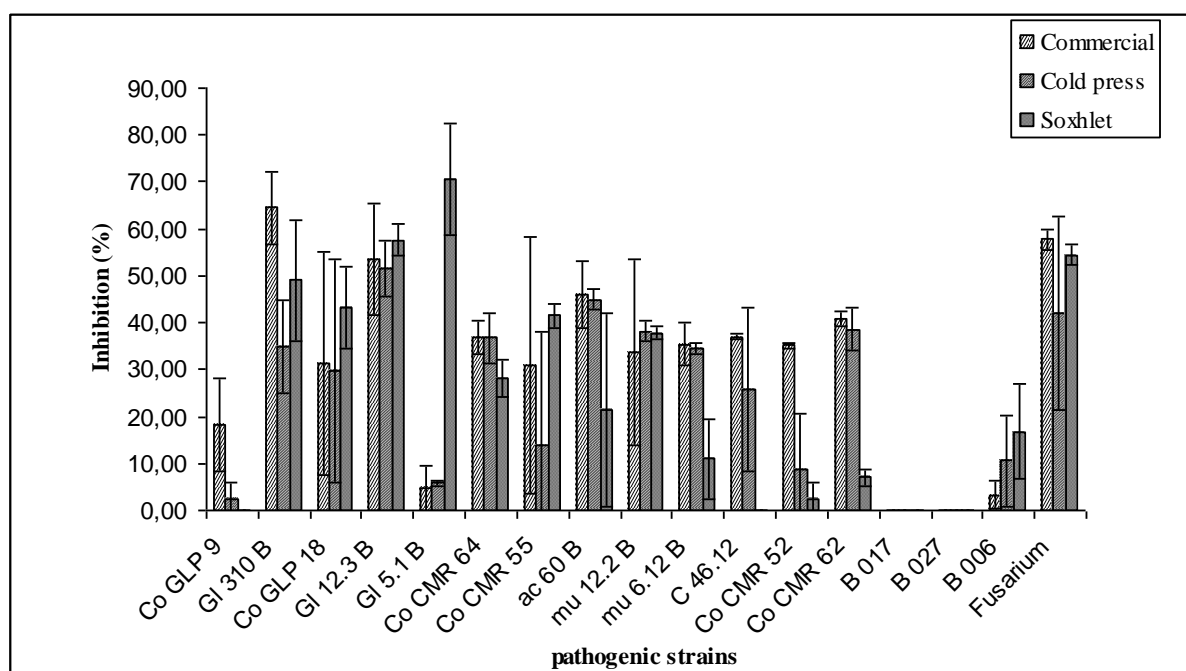


Figure 1. Effect of different neem oil on 17 pathogenic strains

Annexe 2:

**EFFECT OF LACTOPEROXIDASE SYSTEM ON THE CONTROL OF
COLLETOTRICHUM MUSAE ON BANANAS**

Woeheoudama Sagoua¹, Marie - Nöelle Ducamp^{*1}, Gérard Loiseau^{1,2}

Luc de Lapeyre de Bellaire³

¹ French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD),
Performance of Tropical Cropping Systems Department (PERSYST), UMR QUALISUD, TA 50/16,
Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

² International Centre of Higher Education in Agriculture Science (Montpellier SupAgro), B.P.5085,
34033 Montpellier Cedex 1, France.

³ French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD),
Performance of Tropical Cropping Systems Department (PERSYST), UR 'banana and pineapple cropping
systems', TA B-26/PS4, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

*Author to whom correspondence should be addressed Tel: 33(0)467615800 (ext. 5295); Fax: 33(0)467614433;
e-mail : ducamp@cirad.fr

Summary

Postharvest diseases are a major concern for several plant products, leading to considerable postharvest losses. *Colletotrichum musae* is responsible for anthracnose and is also involved in crown rot, the two main postharvest diseases of bananas. The use of natural anti-microbial agents such as the lactoperoxidase system (LPS) represents an interesting alternative to the use of fungicides for the control of postharvest diseases of bananas.

Conidial germination and fungal growth of 3 different strains of *Colletotrichum musae* originating from Cameroon (C 52 and C 62) and Guadeloupe (C 46.12) was monitored in the presence of LPS or Eau Activée[®] (an industrial derivative of LPS). *In vivo* studies were also conducted on bananas pre-inoculated with strain C 46.12 and then subjected to a soak treatment in LPS and Eau Activée[®] solutions.

The *in vitro* studies showed a difference in the behaviour of the *Colletotrichum musae* strains subjected to LPS and Eau Activée[®] treatments. A highly visible inhibitory effect of LPS was observed on fungal growth of strains C 52 and C 62. Furthermore, LPS gave better results than its industrial derivative, Eau Activée[®]. Nevertheless, postharvest dipping treatments did not show any significant effect of the LPS, neither of the Eau Activée[®].

Key – Words: LPS, Eau Activée[®], *Colletotrichum musae*, postharvest diseases, crown rot, anthracnose

Introduction

Disease control of banana is an essential component of its quality after harvest (1). This quality is affected by postharvest diseases of which the most important are anthracnose caused by *Colletotrichum musae* (Berk & M.A. Curtis) Arx; and crown rot that can be caused by *C. musae* but also by a wide fungal complex (2). Anthracnose appears as lesions on the fruit due to the development of the fungus. The initially brown lesions blacken and become covered with salmon-colored acervuli (3). Crown rot affects the tissues joining the fruit pedicels with each other. When infection is severe, the rot may reach the pedicel and ultimately the banana pulp (4). Postharvest diseases of bananas are mostly controlled by postharvest fungicides such as bitertanol, thiabendazole, imazalil and benomyl (1, 5, 6). However, *Colletotrichum musae* and the fungal complex involved in crown rot have acquired some resistance to these fungicides necessitating doses to be increased (7, 8, 9). One current challenge is thus to find adequate treatments for preserving the fruits in good condition while avoiding environmental and ecological problems. Indeed, the increases in treatment doses can result in fungicide residues on the marketed products (10) and thus harm consumer health. The substitution of chemical treatments by natural treatments of vegetable or animal origin less dangerous to human health and the environment would be a very interesting solution.

Many studies show that compounds derived from certain plants and/or animals have an antimicrobial activity. The Lactoperoxidase system (LPS) found in milk is one such potential treatment (11). This system is composed of three elements which are lactoperoxidase enzyme, thiocyanate ion and hydrogen peroxide. It is the reaction between thiocyanate and hydrogen peroxide, catalysed by lactoperoxidase that produces the antimicrobial element of the system, namely the hypothiocyanate ion (OSCN^-) (12). Inhibitory effects of this system have been shown for a number of bacteria, fungi and viruses (11, 13, 14, 15).

The purpose of this work was to study the effect of the lactoperoxidase system (LPS) on various strains of *Colletotrichum musae* responsible for postharvest diseases of bananas, the desert banana being the second most produced fruit in the world after citrus fruits. The effect of the LPS system and its industrial derivative, “Eau Activée®” (Catallix®), on the conidial germination and fungal growth of 3 different strains of *Colletotrichum musae* was determined. The industrial pilot Catallix® 30 reproduces the reaction of the LPS and produces a continuous supply of Eau Activée® (16) able to control the microbial flora of foodstuffs like eggs, sausages and cured

meats, cheeses, fish and poultry. It can be integrated into the production lines of these foodstuffs and makes it possible to “activate” the treatment water thus conferring it with disinfectant properties.

Materials and methods

The Lactoperoxidase system

Lactoperoxidase system (400 IU/mg) was donated by BIOSERA^E Compagny (France). Sodium percarbonate ($\text{CH}_3\text{Na}_2\text{O}_6$), used as a peroxide generator, and sodium thiocyanate (NaSCN) were purchased from Sigma-Aldrich (France).

The Eau Activée[®] solution

Reagents for the production of Eau Activée[®] were donated by TMI Europe (France).

Microorganisms and inoculum preparation

Three different *Colletotrichum musae* strains obtained from monospore cultures were used: C 52, C 62 and C 46.12. The C 52 and C 62 strains originated in Cameroon from a non-commercial banana plot and the C 46.12 strain in Guadeloupe from an intensive commercial banana farm. These two sources were chosen due to their different cropping systems and scale of cultivation that could potentially lead to different parasitic pressure in the field, and therefore to variable treatment effectiveness. The strains were identified by CIRAD. All the culture media were purchased from DIFCO (France).

Spore suspensions were chosen as inoculum. Fungal cultures (on Potato Dextrose Agar) of *Colletotrichum musae* strains (C 52, C 62, C 46.12) aged 7 to 10 days, were flooded with 10 mL of saline water (9 g/L NaCl), containing 0.05 % Tween 80 to prevent conidia clumping (17). The conidial suspension was filtered through Watmann N° 1 filter paper

Evaluation of the antimicrobial activity of the LPS on conidial germination

1 mL of a 10^6 conidia/mL suspension of *Colletotrichum musae* (C 52, C 62, C 46.12) was diluted in 10 mL of treatment solution: LPS (BIO SERA^E, France), Eau Activée[®] (TMI, France), Thiabendazole (TBZ) (MSD AGVET, France) or chlorinated water.

The treatment lasted 15 min for LPS (lactoperoxidase enzyme, 25 mg/L; sodium thiocyanate, 100 mg/L; sodium percarbonate, 50 mg/L) (18), 20 min for Eau Activée[®] (700 μM of OSCN^- ion) (16), 1 min for TBZ (2mL/L) (1) and 5 min for chlorinated water (80 ppm) (as per French legislation for the use of chlorinated water on foodstuffs). A control was prepared using distilled

water. To enhance the effects of LPS and Eau Activée[®], the pH of these solutions was adjusted to 5.5 using a 0.1 M solution of lactic acid (18). The same was applied to the distilled water to control for any pH related action.

After treatment, 100 µL from each tube was used to inoculate PDA in Petri dishes (three dishes per treatment) (DIFCO, France) using a sterile spreader. The dishes were enumerated using an optical microscope (Labo lux, France) after 4 hours' incubation in an oven at 30°C and the count expressed as percent of germinated conidia.

Each treatment was repeated three times.

Evaluation of the antimicrobial activity of the LPS on fungal growth of C. musae strains in liquid cultures

The culture medium used for these studies was PDA (Potato Dextrose Agar). The pH was adjusted to 5.5 with phosphate buffer (0.2 M $\text{NaH}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). 0.75 mL (3 %) of suspension *Colletotrichum musae* (C.52, C.62, C.4612) were used to inoculate the main culture (25 mL).

The control cultures (25 mL) contained the same substances without the LPS (lactoperoxidase at 25 mg/L, sodium thiocyanate at 100 mg/L and sodium percarbonate at 50 mg/L).

Immediately after inoculation and addition of the LPS reagents for the test culture, the flasks were placed on a rotary shaker at 180 rpm and 30°C. Samples were collected after 0 h, 6 h and 24 h.

Fungal growth was determined by the gain in biomass of the main culture. 5 mL of the main cultures were filtered on membranes (pore Ø 0.45 µm). These membranes were then dried at 105°C for 24h and weighed on a balance to four decimal places until a constant mass was reached (18).

Each test was repeated 3 times.

Evaluation of crown rot control with LPS under artificial inoculation of bananas with Colletotrichum musae strain C 46.12

Plant material

24 clusters, each of 4 Cavendish dessert bananas from Guadeloupe with a ripeness index of 1 (all green), were used.

Preparation of conidial suspensions

Fungal cultures of *Colletotrichum musae* strain C 46.12, aged 7 to 10 days, were flooded with 10 mL of saline water (9 g/L), with 0.05 % tween 80 added. The conidial suspension was filtered through Watmann filter paper N° 1, and adjusted to a final concentration of 10^4 conidia/mL using a Malassez cell.

Inoculation of banana crowns

The crowns of the banana clusters were trimmed by thinly slicing off the outermost tissues, and then surface sterilised with 50 % ethanol. After the ethanol had evaporated, the crowns were inoculated with 50 µL of the conidial suspension (10^4 conidia/mL). The droplet was covered with sterile Watmann filter paper to prevent it from running off. The fruits were then left at ambient temperature for 3 hours.

Soak treatments

A total of 24 clusters were soaked:

- 6 clusters in water (T_1) (1 min)
- 6 clusters in Eau Activée[®] (T_2) (20 mins)
- 6 clusters in LPS (T_3) (20 mins)
- 6 clusters in Baycor 300EC (300g/L of bitertanol) (F) (1 min)

LPS and Eau Activée[®] were used at the same concentrations as in the other experiments.

The 6 clusters subjected to the same treatment were packed in a perforated polyethylene bag and stored at 13°C for 10 days, to simulate shipping. After 10 days, ripening of bananas was

artificially induced by an ethylene treatment (1000 ppm) for 24 h at 20°C in an airtight chamber. The fruits were then aerated and returned to 20°C for 3 days, corresponding to an artificial ripening stage identical to that carried out in commercial ripening rooms.

The progression of internal lesions (ILP) was then observed. This consisted in measuring necrotic areas in split crowns. The necrotic area, with length L and width w, was estimated using the area formula for a rectangle: $A = L \times w$ (19).

Interpretation of results

Analysis of variance (ANOVA) tests were conducted using the software package SPSS 12 OF. If the analysis of variance was found to be significant, post hoc tests were used to identify significantly different treatments. The method used to establish whether there was equality of variance was the Least Significant Difference (LSD), with a set error risk of 5 %.

Results and discussion

Antimicrobial effect of the LPS on various Colletotrichum musae strains

Conidial germination test

The results obtained are presented as both the percentage of conidia germinated according to the treatment and the strain of *Colletotrichum musae* (Fig. 2), and the effectiveness of each treatment on the germination of the conidia compared to the control distilled water treatment (Fig. 1).

For strain C 52, a significant inhibitory effect was observed with all the treatments (LPS, Eau Activée[®], TBZ, chlorinated water) in comparison to the control; TBZ and chlorinated water having the greatest effect (Fig. 1). Indeed, there was respectively 32 %, 28 %, 0 %, and 0 % of germination for Eau Activée[®], LPS, TBZ and chlorinated water compared to 44.3 % for distilled water (Fig. 2).

For strains C 62 and C 46.12, a significant inhibitory effect was found with TBZ and chlorinated water in comparison to the control (Fig. 1). For strain C 62, there was 14 % and 0 % germination for the TBZ and chlorinated water treatments respectively, and for strain C 46.12, 1 % and 0 % germination for the same treatments (Fig. 2). For these two strains, the LPS and Eau Activée[®] treatments had no significant effect on conidial germination (62 %, 61 % and 55 %

germination respectively for the control, Eau Activée[®] and LPS for strain C 62; and 53 %, 48% and 48 % respectively for the control, Eau Activée[®] and LPS for strain C 46.12) (Fig.2).

The effectiveness of TBZ, Eau Activée[®] and LPS differed between the *Colletotrichum musae* strains (Fig. 2).

However, conidial germination does not systematically lead to the expression of disease symptoms. Therefore, the subsequent growth of *Colletotrichum musae* conidia was studied using the biomass method.

Biomass

The biomass at 0 h, 6 h and 24 h was measured for the C 52, C 62 and C 46.12 strains of *Colletotrichum musae* grown on a PDA medium, with different added treatments (LPS, Eau Activée[®], TBZ and chlorinated water). The results obtained for biomass measurements after 24 h growth are those of interest (Figure 3).

A difference in the behaviour of the *Colletotrichum musae* strains with the different treatments was observed. There was a clear inhibitory effect of LPS, TBZ and chlorinated water on strain C 52 after 24 hr growth, but no significant effect with the Eau Activée[®] treatment. It is also noteworthy that strain C 52 had a slow growth on the control treatment as compared with the two other strains. With the Eau Activée[®] treatment, growth remained nearly constant (around 1.50 g/L) regardless of the strain. The ineffectiveness of this treatment may be due to the rapid exhaustion of the active principle present, namely the hypothiocyanate ion in the culture medium. An equivalent inhibitory effect was observed with LPS, TBZ and chlorinated water treatments on strains C 52 and C 62. The LPS had also an inhibitory effect on the growth of strain C 46.12, but this effect was less important than for the TBZ and chlorinated water treatments.

Nguyen et al. (18) showed that at pH 5.5, the LPS had a significant inhibitory effect on the growth of two mango pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae*. They showed that the inhibitory effect was due to OSCN⁻ ions produced by the lactoperoxidase system and not to the hydrogen peroxide present in the system. Popper and Knorr (20) also showed the effect of LPS on other fungi, *Rhodotorula rubra*, *Mucor rouxii*, *Aspergillus niger*, *Byssoschlamys fulva* and *Saccharomyces cerevisiae*. In these experiments, the source of

hydrogen peroxide was glucose oxidase in salt solutions (*Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*) or in apple juice at pH 3.2 (*Mucor rouxii*, *Aspergillus Niger*, *Byssoschlamys fulva*).

Artificial inoculation of banana crowns

After 13 days' treatment, observations were made on the banana clusters. A significant difference was observed between the Baycor treatment and all the other treatments (Figure 4). For the LPS treatment, the necrotic areas found were smaller than in the control and Eau Activée® treated bananas, but this difference was not significant.

In addition, a difference in cluster coloration was observed with each different applied treatment. The Eau Activée® treated bananas and the control bananas had the same coloration, corresponding to level 5 on the dessert banana ripeness colour scale. Those treated with LPS and Baycor on the other hand had stage 4 coloration, which demonstrates an inhibitory effect of LPS on peel color change.

Conclusion

The effect of Eau Activée® and LPS on conidial germination and fungal growth of three different *Colletotrichum musae* strains (C 52; C 62; C 46.12) was studied *in vitro*. Regarding biomass studies, LPS exhibited a similar effectiveness to TBZ and chlorinated water for strains C 62 and C 52, and a similar effectiveness to Eau Activée® for strain C 46.12. However, in terms of conidial germination, the Eau Activée® and LPS had no significant inhibitory effect, even if the LPS was found to be effective on the conidial germination of strain C 52. Overall, Eau Activée® did not exhibit very high effectiveness on the growth of the *Colletotrichum musae* strains. Strain C 62 and C 46.12 grew more quickly than strain C 52, since the biomasses after 24 h growth in distilled water were much greater for these strains than for strain C 52. Furthermore, the biomass for these two strains was greater than for strain C 52 for all of the treatments.

Artificial inoculation on banana crowns was also performed with strain C 46.12. We did not observe a significant difference between the Eau Activée®, LPS treatments and the control. Nevertheless, the LPS treatment resulted in slightly smaller necrotic areas and a difference in

terms of fruit coloration between the treated bananas and the control, and those treated with Eau
Activée[®].

Acknowledgments

The authors wish to thank the company TMI Europe for the loan of material for production of
Eau Activée[®] and M.Lebrun for dedicated technical help.

References

1. J. Joas, S. Malisart, Effect of the application techniques on the effectiveness of the fungicides used in the banana postharvest, *Fruits*, 56 (2001) 383-394.
2. W.R. Slabaugh, M.D. Grove, Postharvest diseases of bananas and their control, *Plant Dis.* 66 (1982) 746-750.
3. D.S. Meredith, Studies on *Gloeosporium musarum* Cke and Massee causing storage rots of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control, *Ann. Appl. Biol.* 48 (1960) 279-290.
4. I.F. Muirhead, D.R. Jones: Postharvest diseases. In: *Diseases of bananas, abacá and enset*, D.R. Jones, (Ed.), CABI Publishing, Wallingford (2000) pp. 190-211.
5. L.E. Rippon, M. Glennies-Holmes, Postharvest dipping of bananas, *Agr. Gaz. New S. Wales*, 84 (1973) 229-231.
6. U. Krauss, A. Johanson, Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands, *Crop Prot.* 19 (2000) 151-160.
7. B. Hostachy, I. Vegh, P. Leroux, E. Jacquemot, S. Foucher, R. Pigou, Incidence of fungic problems on the quality of bananas in Martinique (Franch West Indies), *Phytoma*, 420 (1990) 37-44.
8. A. Johanson, B. Blasquez, Fungi associated with banana crown-rot on fieldpacked fruit from the Windward Island and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz, and imazalil, *Crop Prot.* 11 (1992) 79-83.
9. L. de Lapeyre de Bellaire, Distribution of Thiabendazole-Resistant *Colletotrichum musae* Isolates from Guadeloupe Banana Plantation, *Plant Dis.* 81 (1997) 1378-1383.

- 321 10. A. Veneziano, G. Vacca, S. Arana, F. De Simone, L. Rastrelli, Determination of
322 carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples
323 imported to Italy, *Food Chem.* 87 (2004) 383–386.
- 324 11. A.S. Naidu, Lactoperoxidase, In: *Natural food antimicrobial systems*, A.S. Naidu, (Eds.),
325 CRC Press, Boca Raton, FL (2000) pp 103–132.
- 326 12. B.M. Jacob, E.K. Antony, B. Sreekumar, M. Haridas, Thiocyanate mediated antifungal and
327 antibacterial property of goat milk lactoperoxidase, *Life Sci.* 66 (2000) 2433–2439.
- 328 13. V.M. Marshall, B. Reiter, Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite
329 anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*, *J. Gen. Microbiol.* 120 (1980) 513–516.
- 330 14. L.M. Wolfson, S.S. Sumner, Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review, *J.*
331 *Food Protect.* 56 (1993) 887–892.
- 332 15. J.N. de Wit, A.C. M. van Hooydonk, Structure, functions and applications of lactoperoxidase
333 in natural antimicrobial systems, *Neth. Milk Dairy J.-NE* 50 (1996) 227–244.
- 334 16. J. Julian, Study of Lactoperoxidase system for the preservation of Guadeloupe bananas,
335 *Master of Science Thesis*, ENSIA-SIARC, Montpellier, France (2004).
- 336 17. F.L. Palhano, T.B.T Vilches, R.B. Santos, M.T.D. Orlando, J.A. Ventura, P.M.B. Fernandes,
337 Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores
338 by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil, *Int. J. Food*
339 *Microbiol.*, 95 (2004) 61–66.
- 340 18. D.D. Le Nguyen, M.N. Ducamp, M. Dornier, D. Montet, G. Loiseau, Effect of
341 lactoperoxidase system against three major causal agents of disease on mangoes, *J. Food Protect.*
342 68 (2005) 1497–1500.
- 343 19. L. de Lapeyre, M. Chillet, Y. Chiling-Charles, Determination of banana fruit susceptibility to
344 postharvest diseases: wound anthracnose, quiescent anthracnose and crown rot. *Fruit*, 63 (2008)
345 183–186.
- 346 20. L. Popper, D. Knorr, Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase–
347 hydrogen peroxide–thiocyanate system, *Nahrung*, 41 (1997) 29–33.

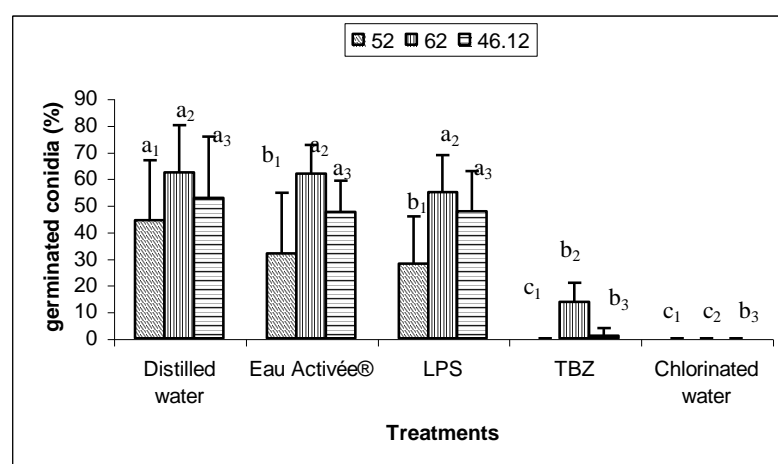
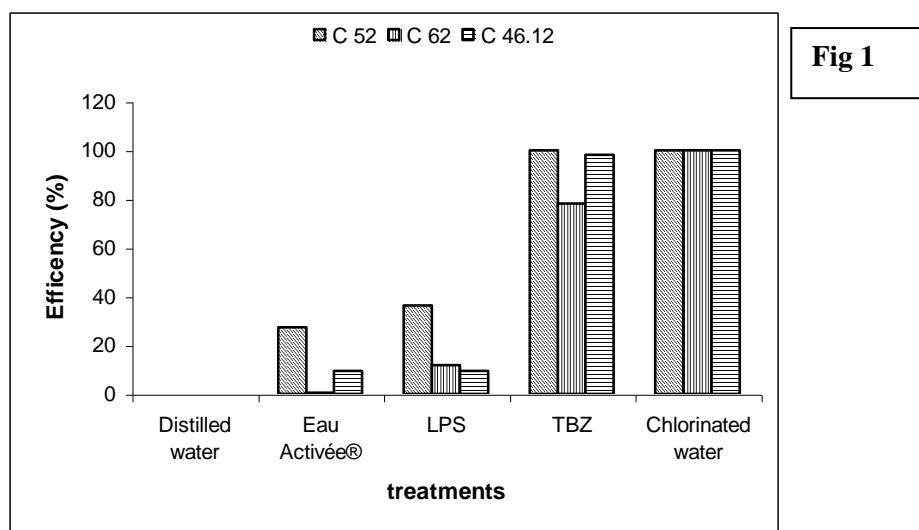
LIST OF FIGURES

Figure 1: Inhibitory efficiency of different treatments (Distilled water, Eau Activée[®], LPS, TBZ and chlorinated water) on the germination of conidia of different strains of *Colletotrichum musae* (C 52, C 62, C 46.12) after 4 h incubation at 30 °C.

Figure 2: Percentage germination of conidia of three strains of *Colletotrichum musae* (C 52, C 62, C 46.12) after 4 h incubation at 30 °C following treatment with distilled water, Eau Activée[®], LPS, TBZ or chlorinated water.

Figure 3: Biomass (g/L) of three *Colletotrichum musae* strains treated with distilled water, Eau Activée[®], LPS, TBZ and chlorinated water after 24 h growth on PDA (pH 5.5) at 30°C.

Figure 4: Average necrotic area (mm²) of banana crowns inoculated with *Colletotrichum musae* strain C 46.12 and treated with water (1min), Eau Activée[®] (20 min), LPS (20 min) and Baycor (1 min).



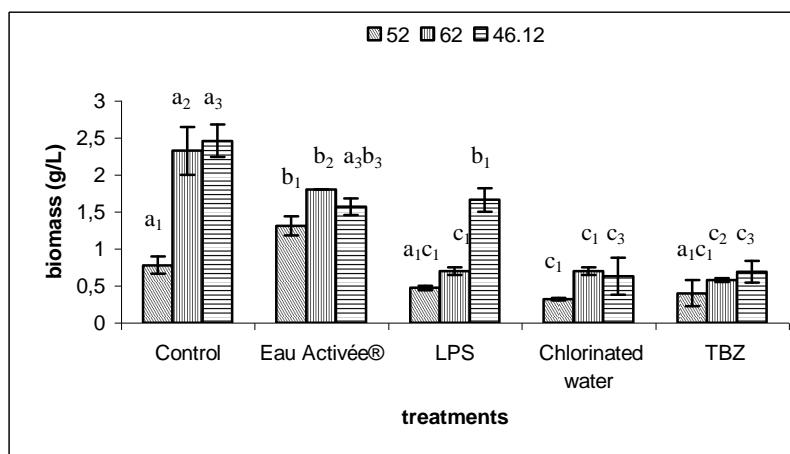


Fig 3

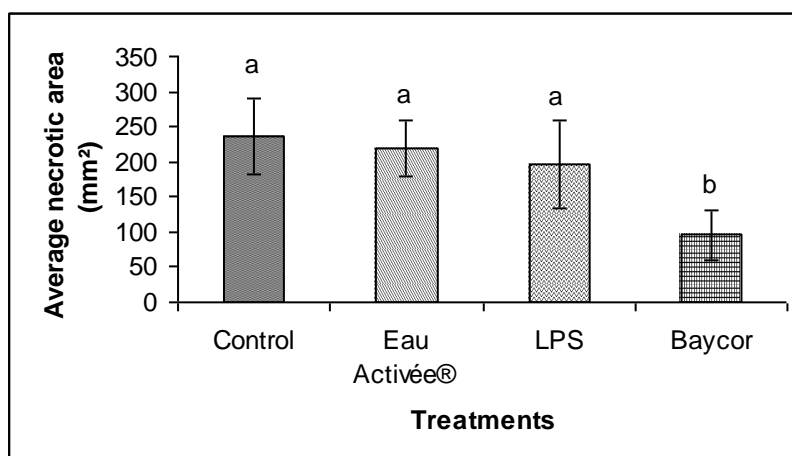


Fig 4

Annexe 3 :

Investigations on Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) oil from Senegal, Cameroon and India for its potential use as an antifungal agent against *against banana* fruit pathogens

Woeheoudama Sagoua ^a, Marie N. Ducamp ^{a*}, Gérard Loiseau ^b, Gilles Morel ^a, Georges Piombo ^c, Alain Coudret ^d

^a CIRAD-PERSYST UMR QUALISUD TA B-95/16, rue Jean-François Breton, 34398

Montpellier Cedex 5, France

^b SupAgro UMR QUALISUD B.P.5085, 34033 Montpellier Cedex 1, France.

^c CIRAD, UMR IATE, Laboratoire de lipotechnie, TA 40/16, 73 rue Jean François Breton,

34398 Montpellier cedex 5 France

^d Faculté des sciences, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 33 rue Louis Pasteur,

84 470 Avignon, France

Abstract

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) kernel oils, from India, Senegal and Cameroon, obtained using a cold press, were assessed for antifungal activity against *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum sp.* and *Fusarium sp.*, three banana pathogens. The oils significantly inhibited mycelial growth of the three fungi tested after 2, 3, 4 and 5 days on PDA medium (2 % v/v) at 30 °C. The Indian oil gave the best inhibition for *Colletotrichum musae* and *Colletotrichum sp.* followed by the Senegalese oil. The oils were also characterized in terms of their composition in fatty acids, volatile compounds and triterpenoids.

Keywords: Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil, antifungal activity, *Colletotrichum musae*, *Fusarium spp.*, GC-MS, LC-MS, postharvest

INTRODUCTION

Disease control of banana is an essential component of fruit quality after harvest (1). The most important postharvest diseases of banana is anthracnose caused by *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx. (2-3) and crown rot that can be caused by *Colletotrichum musae*, but also by a wide fungal complex (4) with *Fusarium spp.* Anthracnose appears as lesions on the fruit due to the development of the fungus. The initially brown lesions blacken and become covered with salmon-colored acervuli (5). Postharvest diseases of bananas are mostly controlled by postharvest fungicides such as bitertanol, benomyl, imazalil and thiabendazole (1, 6-8). However, *Colletotrichum musae* and the fungal complex involved in crown rot have acquired some resistance to these fungicides necessitating doses to be increased (9-11). One current challenge is thus to find adequate treatments for preserving fruits in good condition while avoiding environmental and ecological problems related to excessive pesticide use. Indeed, the increases in treatment doses can result in fungicide residues on the marketed products (12) and thus potentially harm consumer health. The substitution of chemical treatments by natural treatments of vegetable origin, like Neem oil, which are safe for human health and the environment, would be a very interesting solution.

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) is a tropical and subtropical species of the Meliaceae family indigenous to India and South East Asia (13), that is today grown in many Asian countries and in tropical regions of the western hemisphere (14).

The Neem tree has been known for centuries in India as the “village dispensary” (15) and indeed, various Neem parts have been used by Indians in cooking and in folk medicine to treat malaria and other afflictions (16, 17). More recently Neem oil or Neem extracts have been used against pre- and postharvest fungi such as *Aspergillus sp.*, *Phytophthora infestans* (18), *Fusarium verticillioides* (19), *Rhizoctonia solani*, *Scelrotium rolfsii*, *Sclerotinia alternata*, *Aspergillus niger* (20).

The present work was undertaken to test the antifungal activity of Neem oils from three different origins (India, Senegal and Cameroon) against 3 bananas pathogens (*Colletotrichum musae*, *Colletotrichum spp.* and *Fusarium spp.*).

MATERIAL AND METHODS

Strains molds

Colletotrichum musae (C 62), *Colletotrichum spp.* (Co CMR 55) and *Fusarium spp.* isolated from Cameroonian symptomatic fruit (banana) were purified and preserved by CIRAD Baillarguet (Phytopathology service) at -80 °C in glycerol 10 % (v/v). Isolates were maintained on potato dextrose agar (PDA) (Difco, Montpellier, France) at 30 °C for 3 days. After the 3 days, agar plug containing mycelia and spores of the fungus was aseptically collected and maintained on another PDA agar dish for 7 to 14 days in an oven at 30 °C in dark before used.

Neem Kernels

Neem kernels from three different origins (India, Senegal and Cameroon) were collected by ISRA (Senegalese Institute of Agricultural Research, Thiès, Senegal); the Shree Keshaw Company (New Dehli, India) and INIBAP (Garoua, Cameroon).

Oil extraction

The kernels were dried in an oven at 55 °C for 2 days and the oils extracted with a cold mechanical expeller (Komet CA 59G, IBG Monforts Oekotec GmbH & Co. KG, Monchengladbach, Germany). The oils were filtered and conditioned into aluminium bottles.

Transformation into fatty acids methyl esters (FAME) and GC analysis of fatty acids composition of Neem oil

The fatty composition of Neem oil was determined as described by Piombo et al. (21). In 25 mL round bottom flask, 10 mg of Neem oil were added to 3 mL sodium methylate solution with phenolphthalein. The reaction mixture was refluxed for 10 min. 3 mL chlorhydric methanol was added to phenolphthalein discoloration and the mixture refluxed for a further 10

min and then cooled to ambient temperature. Eight ml hexane and 10 mL distilled water were added and the organic phase recovered, dried over anhydrous sodium sulfate and filtered for subsequent GC analysis using Agilent 6890 series (Bios Analytique, France) using a Supelcowax 10 capillary column (SGE, Courtaboeuf, France) with the following characteristics: length, 30 m; internal diameter, 0.32 mm, film thickness 0.25 μ m, Fatty acid methyl esters were directly injected into the GC. Carrier gas: Helium flow rate 2.2 mL/min, splitting ratio: 1/80. Injector temperature: 250 °C, FID detector temperature: 270 °C. The temperature settings were as follows: 150 °C to 225 at 5 °C/min, 225 °C for 20 min. Quantitative data were given by a D-2500 integrator (Merck, Darmstadt, Germany). Peak area percentages obtained with the integrator were divided by the molecular weight of individual FAMES (FAME standards were purchased from Sigma-Aldrich, France) to yield mole percents of fatty acids.

Volatile compounds analysis using Gas Chromatography system

The oils were analyzed using an Agilent 6890N series gas chromatograph (Agilent technologies, Massy, France) in tandem with an Agilent MSD 5973N mass spectrometer (MS) detector using a DB-Wax capillary column (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m film thick). The temperature was programmed from 40 °C to 240 °C (3 °C/min until 160 °C and 10 °C/min until 240 °C). Helium was used as a carrier gas at 1 mL/min constant flow rate and a scan range of 40 to 250 Daltons with the MS at 70 eV with an ion source temperature of 230 °C. Identification of components was carried out by reverse fitting with NIST standard spectra and from linear retention index values (22).

Triterpenoids extraction

Fifty mL of the three different Neem oils, obtained by using a cold mechanical expeller was partitioned between hexane (50 mL) (Carlo Erba, Val de Reuil, France) and 90 % methanol (75 mL) (Carlo Erba, Val de Reuil, France) as described by Govindachari et al. (23). The methanol extract was concentrated to dryness under vacuum at 45 °C. Then the residue was re-dissolved in 5 ml methanol and filtered through a 0.45µm pore diameter Teflon membrane before analysis by HPLC-MS.

Liquid chromatography (LC-UV-MS)**HPLC conditions**

Analyses were carried out with an HPLC SURVEYOR plus model equipped of an auto sampler, a PDA detector and LC pumps (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA). The chromatograph was an HPLC electro-spray equipped with a 250 mm x 4.6 mm, 5µm Interchim Lischrospher ODS-2 column (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) maintained at 40 °C. UV detection was performed at a wavelength of 217 nm. The mobile phase was water and methanol in isocratic gradient (50:50) at a flow-rate of 0.7 mL/min.

MS conditions

Samples were analysed in APCI and ESI positive and negative modes. For the APCI mode, probe temperature was 400 °C with a source block temperature of 150 °C. For the ESI mode, a source block temperature of 345 °C was used. The nitrogen flow rates were 60 and 55 mL/min for APCI and ESI respectively.

Antifungal activity of Neem oils *in vitro****Inoculum***

The inoculum was a 5 mm diameter PDA plug containing mycelia and spores of the fungus collected from growing fungi of 7 days at 30 °C.

Incorporation of Neem oil into the culture medium

The PDA medium with 0.05 % (v/v) of Tween 80 was prepared and supplemented aseptically with Neem oil to a final concentration of 2 % (v/v). This concentration was chosen as the optimal concentration (between 0.5, 1 and 2 % v/v) determined in an experiment not reported in this work. After pouring the media into Petri dishes, the inoculum was placed at the centre of each Petri dish after the PDA had solidified. Control plates were prepared in the same way, but using PDA without Neem oil.

Mycelial growth (colony radius in mm) was observed and measured every day for five days.

The experiment was carried out with 5 replicate plates per Neem oil origin and per fungal isolate and the data expressed as percentage inhibition of mycelial growth according to the following formula (24-25):

$[(C-T)/C] \times 100$; where C = colony radius of the pathogen when growing without essential oil; and T = colony radius of the fungal for each Neem oil origin.

Statistical analyses

Results were analysed by ANOVA and the Bonferroni test using XLStat (Addinsoft SARL, Paris, France). Differences of $P \leq 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acids composition of Neem oil

The analysis of Neem oils from Senegal, Cameroon and India showed variable fatty acid compositions (Table 1). The myristic acid content was respectively 0.04 %, 0.04 % and 0.32 % for Senegal, Cameroon and India. The concentration of myristic acid of 0.32 % in the Indian oil is close to values found previously for Indian Neem oils from different regions (26-28).

The palmitic acid content was similar for the three origins as were the contents of palmitic acid, margaric acid and stearic acid. In the case of oleic acid content, a large difference was observed between the African oils (43.87 % and 44.23 % respectively for Senegal and Cameroon) and the Indian oil (52.53 %). The Indian oil oleic acid concentration is similar to that obtained previously by Srivastava and Prasad also for Indian oil (27).

The Indian oil had the lowest concentration of linoleic acid (11.4 %) and the African origin oils the highest (20.33 % and 19.27 % for Senegal and Cameroon).

The African oil profiles were very similar to the fatty acid composition profile of Benin Neem oil described by Gosse et al. (29).

Volatiles composition

Table 2 shows the global composition in volatile compounds of the different Neem oils.

The same classes of compounds were found in all oils, but in different proportions (according to the total chromatogram area). The Indian oil was very rich in acids (12.5 %), alkanes (11 %), aldehydes (10 %) and aromatic heterocycle (19.8 %) (Table 2). Cameroon oil was rich in aldehyde (15 %), aromatic heterocycle compounds (10 %) and thiols (14.8 %) and the Senegalese oil was rich in aldehydes (39.5 %). Indeed, for the Indian oil, the major compound was dimethyl-2,5-thiophene (Fig.1, peak 4), while in the Senegalese oil, peaks 1 and 2 were

respectively 2-methyl-2-butenal and 2-methyl-2-pentenal (Fig.1). These aldehydes have antimicrobial activity according to Zeringue and Bhatnagar (30) and Zeringue and McCormick (31) who observed that these compounds completely inhibited radial growth of *Aspergillus flavus*.

For the Cameroonian oil, peak 5 was identified as disulfide dipropyl, an organosulfur compound. Organosulfur compounds have been found to be highly inhibitory of the growth of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium lycopersici* (32).

The volatile composition of the oils is similar to the composition of Neem seed oil found in the literature (33). It is similar to Neem flower essential oil, Neem leaf extract volatile components and fresh seeds (30, 34-37).

Triterpenoids composition

Figure 2 shows the HPLC chromatogram of Neem oils obtained for three different origins (India, Senegal, and Cameroon). Two ionization techniques (APCI and ESI) were used, but, detection was better by the APCI technique.

The two African origin oils had very similar profiles and peaks, but in different proportions.

Five isomers of azadirachtin (I, H, D, A and B) were identified, the most abundant being azadirachtin A (peak 2). Azadirachtin I, H and D were not detected in the chromatograms because the peaks were very small. Peaks 3, 6 and 9 were respectively azadirachtin B, desacetylnimbin and salanin and the latest two compounds having been reported to have antifungal activity (23).

Peaks 4 and 5 represent none-identified triterpenoids, and the peaks 7, 8 and 10 were not triterpenoids.

The Cameroonian oil was the richest in azadirachtin A which was not detected in the Indian oil. Nevertheless, the Cameroonian oil had the lowest antifungal activity against the

pathogens, indicating that azadirachtin A does not have antifungal activity against these pathogens, which would confirm earlier observations by Govindachari et al. (23) and Biswas et al. (15).

The Senegalese oil had the greatest abundance of deacetylnimbin (peak 6), which may explain its greater antifungal properties compared to the Cameroonian oil. We were unable to identify some triterpenoids like peak 4 and for this compound; the India oil had the biggest abundance. The group of azadirachtin (I, H, D, A, B) was the first peaks that detected followed by deacetylnimbin and salannin. These results were closed with what were described in the literature (38, 39, 40), even though the mobile phase and the gradient used were different.

Antifungal activity of Neem oils on mycelial growth of *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum spp.* and *Fusarium spp.*

Neem kernels oil, whatever their origin, significantly inhibited mycelial growth of *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum spp.* and *Fusarium spp.*, when they were added to the PDA culture medium. For each day of the five days, a significant reduction of fungal growth compared to the control was observed.

For *Colletotrichum musae*, significant differences between the three oil origins were observed (Fig.3a). Differences between the Indian oil and Senegalese oils were slight, but both oils produced a significantly greater reduction in fungal growth than the Cameroonian oil. After 5 days at 30 °C, the Indian oil gave the highest inhibition (60 % inhibition) followed by the Senegalese oil (54 % inhibition) and the Cameroonian oil (38 % inhibition).

The same differences were observed in case of *Colletotrichum spp.* (Fig.3b). Again, after 5 days at 30 °C, the Indian Neem oil gave the highest growth inhibition (67 %) and the Cameroonian oil the lowest (50 %).

For the *Fusarium spp.*, significant inhibition was observed between the control and all of the oils but not between the different oils (Fig.3c). The inhibition was respectively 44 %, 45 % and 37 % for the Indian oil, Senegalese oil and Cameroonian oils after 5 days at 30 °C.

After transferring the fungal plugs of the three pathogens to non-amended PDA medium culture, growth resumed. Thus the activity was fungistatic and not fungicidal. Neem products and Neem oil are better known for their insecticidal effects against some postharvest pests than for their effects against postharvest fungal pathogens (41-43). Nevertheless some studies concerning Neem antimicrobial activity have been carried out. Indeed, Abyaneh et al. (34) reported that Neem leaf and seed extracts at the concentration of 50 % v/v in culture media reduced aflatoxins production inhibition by 90 and 75 %. Mirza et al., (18), also observed a significant inhibition of mycelium growth of *Phytophthora infestans* caused by the Neem seeds oil incorporated into growth medium at the concentration of 1, 2 and 3 % (v/v).

In India oil, we found some peaks which were not triterpenoids like the peaks 7 and 8 which didn't find in the other oils. This compounds can be had antimicrobial activity and gave the India oil the highest antifungal activity.

In summary, Neem oils wherever it origin haves an antifungal activity against the three bananas pathogens.

This inhibition was upper than 35 % for all the pathogens and the oils, after 5 days at 30 °C. Indian oil gave the highest activity against the two *Colletotrichum*, following by Senegalese oil.

Concerning the composition of the oils, we observed the same family of volatile compound for the three oils, but in different proportion. And some of these compounds like aldehyde and organosulfur had known as having antimicrobial activity. For the HPLC profiles of the oils, we observed difference between the African origins and Indian origin, which can explain the antifungal results.

All this good results indicated that employing Neem oil as natural fungicide against bananas pathogens is worthy to further investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank M. Jean-Yves Rey and M. Christian Didier from the Fruits production department for providing us Neem kernels from Senegal and India and M. Guy Self for advising and for revising the English version of this text.

LITERATURE CITED

(1) Joas, J.; Malisart, S. Incidence des conditions d'application sur l'efficacité des fongicides utilisés en post-récolte pour la banane. *Fruits*. **2001**, 56, 383-394.

(2) Waller, J.M. Colletotrichum Diseases of Perennial and other Cash Crops. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, Bailey, J.A., Jeger, M.J., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, **1992**, pp 388.

(3) Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. *Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*, Eds.; APS Press: St Paul, USA, **2000**, pp 400.

(4) Slabaugh, W.R.; Grove, M.D. Postharvest diseases of bananas and their control. *Plant Dis*. **1982**, 66, 746-750.

- 321 (5) Meredith, D.S. Studies on *Gloeosporium musarum* Cke and Massee causing storage rots
 322 of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control. *Ann. Appl. Biol.* **1960**, 48, 279-
 323 290.
- 324 (6) Frossard, P. Action du thiabendazole et du Benlate sur l'antracnose des bananes et son
 325 champignon pathogène *Colletotrichum musae*. *Fruits*. **1969**, 24, 365-379.
- 326 (7) Rippon, L.E.; Glennies-Holmes, M. Postharvest dipping of bananas. *Agricultural Gazette*
 327 *of New South Wales*. **1973**, 84, 229–231.
- 328 (8) Krauss, U.; Johanson, A. Recent advances in the control of crown rot of banana in the
 329 Windward Islands, *Crop Protection*. **2000**, 19, 151-160.
- 330 (9) Hostachy, B.; Vegh, I.; Leroux, P.; Jacquemot, E.; Foucher, S.; Pigou, R. Bananes de la
 331 Martinique. Incidence des problèmes fongiques sur la qualité. *Phytoma*. **1990**, 420, 37-44.
- 332 (10) Johanson, A.; Blasquez, B. Fungi associated with banana crown-rot on fieldpacked fruit
 333 from the Windward Island and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole,
 334 prochloraz, and imazalil. *Crop Prot.* **1992**, 11, 79-83.
- 335 (11) de Lapeyre de Bellaire, L. Distribution of Thiabendazole-Resistant *Colletotrichum musae*
 336 Isolates from Guadeloupe Banana Plantation. *Plant Dis.* **1997**, 81, 1378-1383.
- 337 (12) Veneziano, A.; Vacca, G.; Arana, S.; De Simone, F.; Rastrelli, L. Determination of
 338 carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples
 339 imported to Italy. *Food Chem.* **2004**, 87, 383–386.
- 340 (13) Kunfel. G. Flowering trees in subtropical gardens; Dr. Junk, W: The hague, **1978**, pp
 341 246.
- 342 (14) Sidhu. O.P.; Kumar. V.; Behl, H.M. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with
 343 Respect to Azadirachtin Content. *J. Agric.Food Chem.* **2003**, 51, 910-915.
- 344 (15) Biswas, K.; Chattopadhyay, I.; Banerjee, R.K.; Bandyopahyay, U. Biological activities
 345 and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr. Sci.* **2002**, 82, 1336-1345.

- 346 (16) Nadkarni, A.K. In *Indian material medica*, 3 rd ed.; Nadkarni, K.M., Eds. popular Book
 347 Depot: Bombay, India, **1954**, Vol. n° 1, pp. 1209.
- 348 (17) Dey, K.L., Mair, W. *The indigenous drugs of India*, 2 nd ed., Eds; Pama Primlane.
 349 Chronica Botanica: New Delhi, India, **1973**, pp. 1896-1897.
- 350 (18) Mirza, J.I.; Hameed, S.; Ahmad, I.; Ayub, N.; Strang, R.H.C. *In vitro* Antifungal activity
 351 of Neem products against *Phytophthora infestans*. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2000**, 3, 824-828.
- 352 (19) Fandohan, P.; Gbenou, J.D.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W.F.O.; Wingfield, M.J.
 353 Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin. *J.Agric.Food*
 354 *Chem.* **2004**, 52, 6824-6829.
- 355 (20) Locke, J.C. Fungi. In *The Neem Tree, Source of unique natural products for integrated*
 356 *pest management, Medecine, Industry and Other Purposes*, Schmutterer, H., Eds.; VCH:
 357 Weinheim, Germany, **1995**, pp. 118-125.
- 358 (21) Piombo, G.; Barouh, N.; Barea, B.; Boulanger, R.; Brat, P.; Pina, M.; Villeneuve, P.
 359 Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora*
 360 *edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux Corps gras Lipides.* **2006**, 13, 195-199.
- 361 (22) Davies, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and
 362 sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *J. Chromatogr.* **1990**, 503, 1-
 363 24.
- 364 (23) Govindachari, T.R.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Banumathy, B.; Masilamani, S.
 365 Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*.
 366 *Phytoparasitica.* **1998**, 26, 1-8.
- 367 (24) Regnier, T.; du Plooy, W.; Combrinck, S.; Botha, B. Fungicitoxicity of *Lippia*
 368 *scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest
 369 spoilage pathogens. *Post. Biol. Technol.* **2008**, 48, 254-258.
- 370 (25) Plaza, P.; Torres, R.; Usall, J.; Lamarca, N.; Vina, I. Evaluation of the potential of

- 371 commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. *J. Hort. Sci.*
 372 *Biotechnol.* **2004**, 79, 935-940.
- 373 (26) Kaushik, N.; Virt, S. Variations in fatty acid composition of neem seeds collected from
 374 the Rajasthan state of India. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 880-882.
- 375 (27) Kaushik, N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta*
 376 *indica* seeds by HPLC and GLC. *Anal Bioanal Chem.* **2002**, 374, 1199-1204.
- 377 (28) Srivastava, A.; Prasad, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew. Sust. Energy Rev.*
 378 **2000**, 4, 111-133.
- 379 (29) Gosse, B.; Amissa, A.A.; Adje, F.A.; Niamke, F.B. Analysis of components of Neem
 380 (*Azadirachta indica*) oil by diverse chromatographic techniques. *J. liq. Chromatograph. Relat.*
 381 *Technol.* **2005**, 28, 2225-2233.
- 382 (30) Zeringue, H.J.; Bhatnagar, D. Effects of Neem leaf volatiles on submerged cultures of
 383 aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 3543-3547.
- 384 (31) Zeringue, H. J.; McCormick, S.P. Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus*
 385 incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicon.* **1989**, 28,
 386 445-448.
- 387 (32) Kahn, M.W.; Alam, M.M.; Khan, A.M.; Sarena, S.K. Effect of water-soluble fraction of
 388 oil-cakes and bitter principles of neem on some fungi and nematodes. *Acta Bot. Indica.* **1974**,
 389 2, 120-126.
- 390 (33) Zeringue, H.J.; Shih, Jr.B.Y.; Bhatnagar, D. Effects of clarified Neem oil on growth and
 391 aflatoxin B₁ formation in submerged and plate cultures of aflatoxigenic *Aspergillus spp.*
 392 *Phytoparasitica.* **2001**, 29, 361-366.
- 393 (34) Abyaneh, M.R.; Allameh, A.; Al-Tiraihi, T.; Shams, M. Studies on the mode of action of
 394 Neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed extracts on morphology and aflatoxin production
 395 ability of *Aspergillus parasiticus*. *Acta Hort.* **2005**, 675, 123-127.

- 396 (35) Kurose, K.; Yatagai, M. Components of essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss.
 397 *Azadirachta siamensis* Velton. and *Azadirachta excels* (Jack) Jacobs and their comparison. *J.*
 398 *Wood Sci.* **2005**, 51, 185-188.
- 399 (36) Balandrin, M.F.; Lee, S.M.; Klocke, J.A. Biologically active volatile organosulfur
 400 compounds from seeds of the Neem tree. *Azadirachta indica* (Meliaceae). *J.Agric.Food*
 401 *Chem.* **1988**, 38, 1048-1054.
- 402 (37) Aromdee, C.; Anorach, R.; Sriubolmas, N. Essential oil of the flower of *Azadirachta*
 403 *indica* (Meliaceae). *Acta Hort.* **2005**, 679, 11-14.
- 404 (38) Barrek, S.; Paisse, O. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of
 405 azadirachtin-A in a controlled environment Characterization of degradation products by
 406 HPLC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem.* **2004**, 378, 753-763.
- 407 (39) Johnson, S.; Morgan, E.D. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids
 408 from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J.Chromatogr A.* **1997**, 761, 53-63.
- 409 (40) Schaff, O.; Jarvis, A.P.; van der Esch, S.A.; Giagnacovo, G.; Oldham, N.J. Rapid and
 410 sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*)
 411 by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass
 412 spectrometry. *J.Chromatogr A.* **2000**, 886, 89-97.
- 413 (41) Lale, N.E.S.; Abdulrahman, H.T. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed
 414 oil obtained by different methods and neem power for the management of *Callosobrochus*
 415 *maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *J. Stor. Prod. Res.* **1999**, 35, 135-
 416 143.
- 417 (42) Makanjuola, W.A. Evaluation of extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) for the
 418 control of some stored product pests. *J. Stor. Prod. Res.* **1989**, 25, 231-237.

(43) Nathan, S.S.; Kalaivani, K.; Murugan, K. Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **2006**, 65, 102-107.

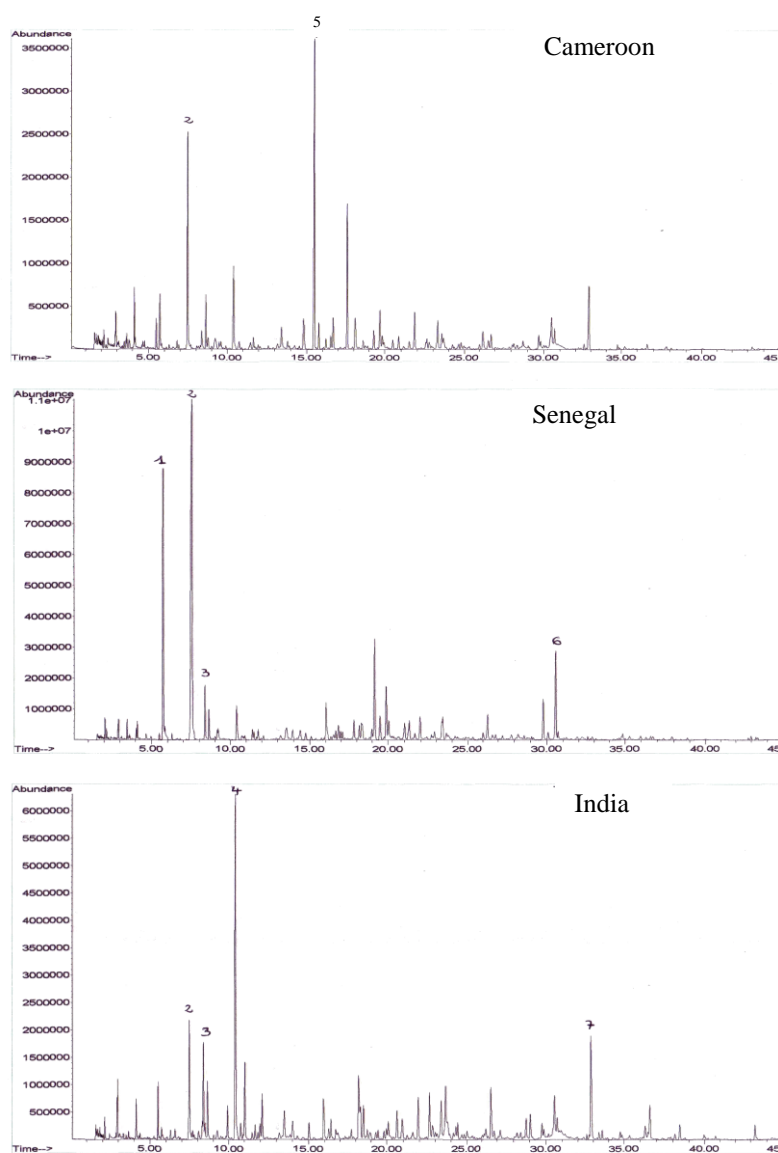


Figure 1: Chromatograms of volatiles compounds found in Neem kernels oils from different origins (Cameroon, Senegal, and India) obtained by GC-MS

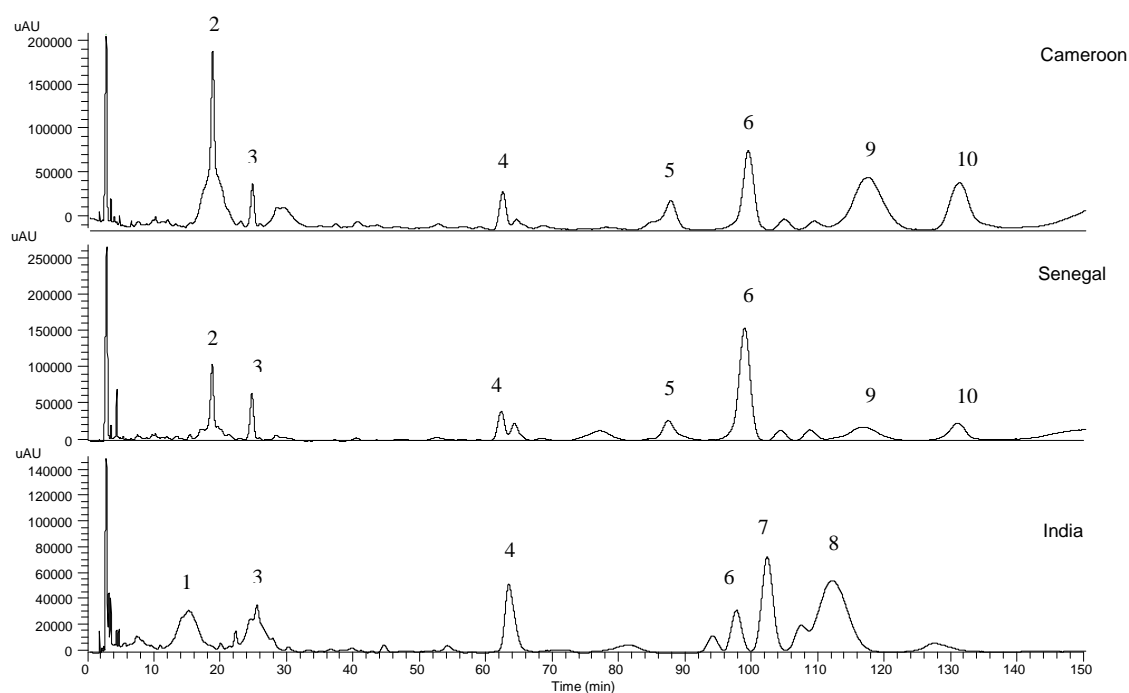


Figure 2: Chromatograms of triterpenoids found in Neem kernels oil from different origins (Cameroon, Senegal and India) obtained by HPLC-MS

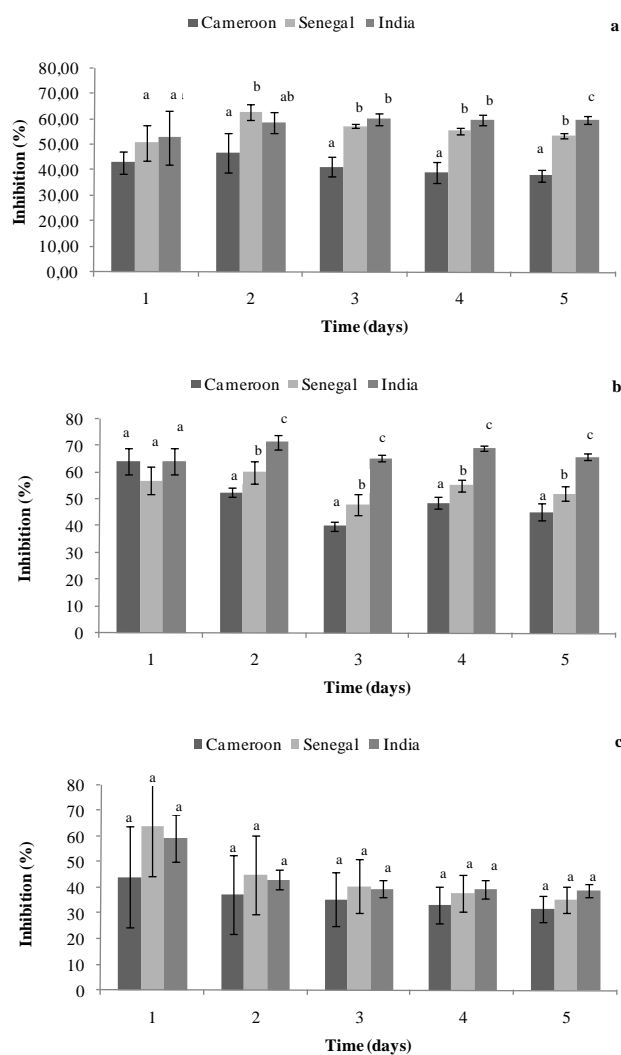


Table 1: Fatty acids composition of Neem kernel oils (%) from three geographical origins

Fatty acids	Senegal	Cameroon	India
C14 :0	0.04 ± 0.006	0.04 ± 0.032	0.32 ± 0.015
C16 :0	16.35 ± 0.156	18.09 ± 1.289	17.39 ± 0.15
C16 :1	0.1 ± 0.032	0.11 ± 0.006	0.09 ± 0.032
C17 :0	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.012	0.14 ± 0.006
C18 :0	17.32 ± 0.114	16.3 ± 0.524	15.96 ± 0.244
C18 :1	43.87 ± 0.065	44.23 ± 0.575	52.53 ± 0.087
C18 :2	20.33 ± 0.082	19.27 ± 0.423	11.4 ± 0.058
C18 :3 (n-3)	0.51 ± 0.017	0.56 ± 0.044	0.52 ± 0.01
C20 :0	1.26 ± 0.017	1.18 ± 0.165	1.53 ± 0.046
C20 :1	0.08 ± 0.012	0.08 ± 0.021	0.12 ± 0.036
TOTAL	100	100	100

Table 2: Volatiles composition of Neem kernel Oils (%) from three geographical origins

Family	Neem Senegal	Neem Cameroon	Neem India
ACID	2.17	3.25	12.51
ALKANE	6.67	3.06	11.33
ALKENE	0	2.21	4.31
ALCOHOL	3.8	6.71	4.71
ALDEHYDE	39.53	15.01	10.19
KETONE	3.47	0.17	4.08
AROMATIC HETEROCYCLE	6.91	10.36	19.85
TERPENE	0	2.23	0.57
THIOL	0.21	14.8	4.05

Annexe 4: Poster présenté au 11^e Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales (Grasse, 17 au 19 Avril 2009)

Etude *in vitro* de l'activité antifongique de l'huile de neem sur les pathogènes de la banane



Le neem,
arbre d'origine indienne

SAGOUA W.¹, DUCAMP M.N.¹, LOISEAU G.²
¹ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Département Performances des Systèmes de production et de Transformation (PERSYST), UMR QUALISUD, TA B-95/16, Av. Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
² IRC/SupAgro Montpellier, 1101 Av. Agropolis, B.P.5085 34033 Montpellier Cedex 1, France

Le neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae), est une plante médicinale utilisée depuis des millénaires dans la tradition Ayurvédique en Inde. Cette plante ou ses extraits sont utilisés en agriculture comme pesticide et/ou répulsif d'insectes. Ces propriétés sont dues à des composés triterpéniques et plus particulièrement à l'azadirachtine présente dans toutes les parties de la plante.

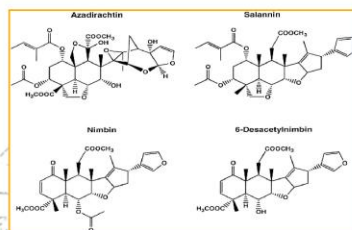
Objectifs

Dans le but de limiter l'utilisation post récolte de fongicides chimiques pour la conservation en frais de la banane nous avons déterminé l'effet antifongique de l'huile de Neem sur la croissance de 3 pathogènes microbiens de la banane qui sont *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum sp.* et *Fusarium sp.*

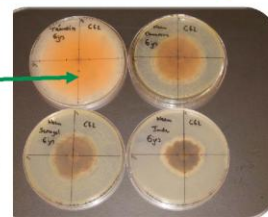
Matériel et méthodes

Les pathogènes ont été cultivés dans du milieu de culture potato dextrose agar (PDA) additionné d'huile de Neem (2 % v/v) de 3 origines différentes (Inde, Cameroun, Sénégal). Après respectivement 2, 5 et 6 jours d'incubation à 30 °C, la croissance des souches pathogènes a été mesurée comparativement à celle d'une culture témoin sans huile de Neem.

Composés
antimicrobien
du Neem



Témoin
sans huile



Culture de *Colletotrichum musae* dans un milieu nutritif contenant de l'huile de Neem

Résultats

Les résultats obtenus ont montré une inhibition de la croissance des pathogènes de l'ordre de plus de 30 % pour tous les pathogènes testés ce qui démontrerait la présence de(s) molécule(s) antifongique(s) dans l'huile de Neem.

